

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Das Tuberoinfundibuläre Peptid von 39 Aminosäuren (TIP39): Gen-Struktur und  
Expressionsmuster im Zebrafisch und Mäusehirn**

Inaugural – Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilian-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Sebastian Fabian Wortmann  
aus Bamberg

Würzburg, Mai 2008

*Meinen lieben Eltern*

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. Eberhard Blind

**Koreferent:** Prof. Dr. Bruno Allolio

**Zweitprüfer:** Priv.-Doz. Dr. Martin Gasser

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 8. Dezember 2008

Der Promovend ist Arzt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Tuberoinfundibuläre Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Entdeckung	1
1.1.2	Das für das humane TIP39 kodierende Gen	2
1.1.3	Strukturanalysen von humanem PTH und TIP39	3
<b>1.2</b>	<b>Der PTH2-Rezeptor</b>	<b>5</b>
1.2.1	Stellung in der Sekretin-Calcitonin-PTH-Rezeptorfamilie	5
1.2.2	Aktivierung und Signaltransduktion	5
1.2.3	Gewebeverteilung	6
<b>1.3</b>	<b>Mögliche physiologische Funktionen des TIP39</b>	<b>7</b>
1.3.1	Neurotransmitter für die Nozizeption	7
1.3.2	Modulation der Hypothalamus-Hypophysen Achse	8
1.3.3	Steuerung des Kalzium-Phosphat Haushalts	8
1.3.4	Vasodilatatorische Effekte auf renale Gefäße	9
1.3.5	Inhibition der Zellproliferation	9
1.3.6	Negative Inotropie am Herzen	10
<b>1.4</b>	<b>Der Zebrafisch als entwicklungsbiologisches Modell</b>	<b>10</b>
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien tierischer Herkunft</b>	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Bakterien</b>	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Vektoren</b>	<b>13</b>
<b>2.4</b>	<b>Enzyme</b>	<b>13</b>
<b>2.5</b>	<b>Antikörper</b>	<b>14</b>
<b>2.6</b>	<b>Kommerzielle Kits</b>	<b>14</b>
<b>2.7</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>14</b>
<b>2.8</b>	<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>15</b>
<b>2.9</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>16</b>
<b>2.10</b>	<b>Synthetische Polynukleotide</b>	<b>16</b>
<b>2.11</b>	<b>Geräte</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Grundlagenmethoden</b>	<b>19</b>
3.1.1	Vermehrung von Bakterien mittels Übernachtkultur	19
3.1.2	Anlegen einer Glycerinkultur	19

3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA	19
3.1.4 Isolation von Total-DNA aus Geweben	20
3.1.5 Isolation von mRNA aus Geweben	20
3.1.6 Restriktionsverdau von DNA	21
3.1.7 Fällung von DNA	22
3.1.8 Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung von DNA	22
3.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA	22
3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	23
3.1.11 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen	23
3.1.12 Vermehrung von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion	23
3.1.13 Gelelektrophorese mit Agarosegelen und Isolation von DNA-Banden	25
3.1.14 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCRII-TOPO-Vektor	26
3.1.15 Sequenzvergleiche mittels Computer-Programmen im <i>world wide web</i>	28
<b>3.2 <i>In-situ</i> Hybridisierung</b>	<b>28</b>
3.2.1 Ziel der Methode	28
3.2.2 Herstellung einer geeigneten Digoxigenin-markierten RNA-Sonde	29
3.2.3 Dot Blot zur Abschätzung des Färbepotentials der Sonden	29
3.2.4 Herstellung von Gefrierschnittpräparaten	30
3.2.5 Hybridisierung der RNA-Sonde mit der komplementären mRNA	31
3.2.6 Detektion der Digoxigenin-Markierung	31
<b>3.3 Reverse-Transkriptase-PCR</b>	<b>32</b>
3.3.1 Ziel der Methode	32
3.3.2 Durchführung	33
3.3.3 Steigerung der Aussagekraft mittels $\beta$ -Aktin-Kontrolle	33
<b>3.4 RACE-PCR</b>	<b>34</b>
3.4.1 Hintergrund der Methode	34
3.4.2 Durchführung und Optimierung	35
<b>3.5 Genomische Analyse mittels Southern Blot</b>	<b>36</b>
3.5.1 Ziel und Hintergrund der Methode	36
3.5.2 Vorbereitung der genomischen DNA	37
3.5.3 Auftrennung mittels Gelelektrophorese	37
3.5.4 Blotting der DNA auf eine Nylonmembran	37
3.5.5 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter RNA-Sonde	38
3.5.6 Immunologische Detektion von Banden	38
<b>3.6 Genomische Lokalisationsbestimmung mittels Radiation Hybrid Mapping</b>	<b>39</b>
3.6.1 Ziel und Hintergrund der Methode	39
3.6.2 Praktische Durchführung	39
3.6.3 Auswertung am Computer	40
<b>3.7 <i>In-situ</i> Hybridisierung am <i>whole-mount</i> Zebrafisch Embryo</b>	<b>40</b>
3.7.1 Vorbereitung der Zebrafisch Embryonen	40
3.7.2 Herstellung der Hybridisierungs-Sonde für drTIP39	41
3.7.3 Durchführung der Hybridisierung	41
3.7.4 Detektion der Hybride	41
<b>3.8 Knockown Experimente mit der Morpholino-Technik beim Zebrafisch</b>	<b>42</b>
3.8.1 Ziel und Hintergrund der Methode	42
3.8.2 Durchführung der Morpholino-Injektionen	43
3.8.3 Auswertung des Knock-downs	43
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
<b>4.1 Studien zum TIP39 des Zebrafisches</b>	<b>44</b>

4.1.1 Blast-Suche nach dem TIP39 des Zebrafisches	44
4.1.2 Bestätigung der Sequenz mittels PCR	45
4.1.3 RACE-PCR für die Zebrafisch TIP39 cDNA	46
4.1.4 Genomischer Southern Blot für das Zebrafisch TIP39	47
4.1.5 Radiation Hybrid Mapping des Zebrafisch TIP39	48
4.1.6 Studien zur genomischen Sequenz des Zebrafisch TIP39	49
4.1.7 Verlauf der Expression von TIP39 während der Zebrafischentwicklung	52
4.1.8 Expressionsnachweis von drTIP39 mittels <i>in-situ</i> Hybridisierung	52
4.1.9 TIP39 Knockdown mittels Morpholino-Injektion	53
<b>4.2 Sequenzvergleiche TIP39 verschiedener Spezies</b>	<b>57</b>
<b>4.3 Auswertung der <i>in situ</i>-Hybridisierung von murinem TIP39 am Mäusehirn</b>	<b>58</b>
4.3.1 Ergebnis des Dot Blots	58
4.3.2 Nachweis von TIP39 mRNA im Cortex des Mäusehirns	58
4.3.3 Nachweis von TIP39 mRNA im Kleinhirn des Mäusehirns	61
4.3.4 RT-PCR für murines TIP39 in verschiedenen Mausgeweben	63
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Einfluss von TIP39 auf frühe Neurogenese und Segmentierung in Somiten</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Bedeutung von TIP39 bei der Entwicklung des Vorderhirns</b>	<b>66</b>
<b>5.3 Einfluss von TIP39 auf die Nozizeption</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Bedeutung von TIP39 bei der Generierung von Bewegung</b>	<b>68</b>
<b>5.5 Allgemeine Charakterisierung des TIP39-PTH2-Rezeptor-Systems</b>	<b>70</b>
<b>5.6 Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>

### **1 Einleitung**

Im Zuge der rasanten Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie wurden in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts immer mehr Familien von G-Protein gekoppelten Rezeptoren kloniert, so auch die Familie der Calcitonin-PTH-Sekretin-Rezeptoren. Neben dem zuerst entdeckten PTH1-Rezeptor, für den eine vergleichbar starke Aktivierbarkeit sowohl durch Parathormon (PTH), als auch durch das Parathormon related Peptid (PTHrP) besteht, wurde 1995 von der Arbeitsgruppe um Ted Usdin (Boston) ein weiterer Rezeptor kloniert, der PTH2-Rezeptor, der zwar auch von PTH aktiviert wird, nicht aber durch PTHrP<sup>1</sup>. Es fand sich die stärkste Expression des PTH2-Rezeptors im Gehirn, wo jedoch keine entsprechend hohe PTH Expression detektierbar war. Auf der Suche nach dem richtigen Liganden für den PTH2-Rezeptor filterte man 1999 aus einem hypothalamischen Extrakt des Rindes ein Polypeptid heraus, das aus 39 Aminosäuren bestand und im Weiteren als „Tuberoinfundibuläres Peptid aus 39 Aminosäuren“, kurz TIP39, bezeichnet wurde. Hierbei könnte es sich um den natürlichen Liganden des PTH2-Rezeptors handeln.

#### **1.1 Das Tuberoinfundibuläre Peptid aus 39 Aminosäuren (TIP39)**

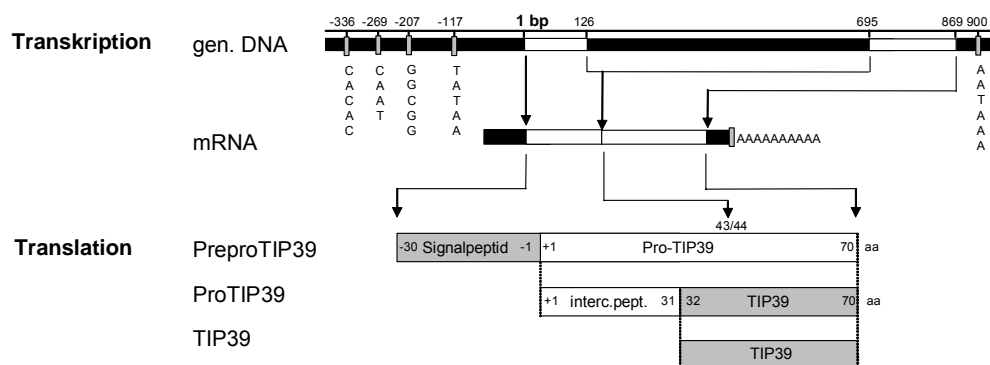
##### **1.1.1 Entdeckung**

Die örtliche Diskrepanz der Expression zwischen Rezeptor (PTH2-Rezeptor), welche vor allem im ZNS gefunden wurde<sup>2</sup>, und zuvor postuliertem Liganden (PTH), wofür im Gehirn nur eine geringe Expression<sup>3</sup>, etwa beim Schaf<sup>4,5</sup> belegt wurde, führte zu einer intensiven Suche nach dem physiologisch relevanten Liganden<sup>6</sup>. Zuerst wurde in Datenbanken mittels Blast-Programmen gesucht, da man eine weitgehende Übereinstimmung mit PTH vermutete, was aber zu keinem Ergebnis führte. Folglich musste der Ligand biochemisch detektiert werden. Hierfür wurde ein Assay entwickelt, mit dem die PTH2-Rezeptor vermittelte intrazelluläre Erhöhung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) nach Stimulation mit verschiedenen Gewebeextrakten quantifiziert werden konnte. Es fand sich die größte Stimulierung bei einem Extrakt aus dem bovinen Hypothalamus. Dieser Extrakt wurde daraufhin in einer HPLC säulenchromatographisch fraktioniert und mit den daraus erhaltenen Peptidfraktionen der Assay wiederholt. Hier konnte die größte Aktivierung des PTH2-Rezeptors bei einem bisher unbekanntem Polypeptid aus 39 Aminosäuren, dem TIP39, nachgewiesen werden<sup>7</sup>. Durch Sequenzvergleiche des bovinen TIP39 mit humanen Genbankdaten

mittels Blast-Programmen im *world wide web*, wurde der humane *GenBank* Klon No.AC068670 gefunden, der sich als 100% identisch mit dem neu isolierten bovines Peptid TIP39 herausstellte. Der Genlocus wurde auf Chromosom 19q13.33 gefunden<sup>8</sup>.

### 1.1.2 Das für das humane TIP39 kodierende Gen

Das humane TIP39-Gen beginnt 5'-seitig der TATAA-Box mit einer untranslatierten Region von 102 Basenpaaren (bp). In diesem Bereich könnte sich noch ein weiteres Exon U1 befinden. Es folgt ein 126 bp langes Exon 1, gefolgt vom 569 bp langen Intron 1. Daraufhin kommt Exon 2 mit 174 bp, ehe sich in einem Abstand von 31 bp die Polyadenylierungssequenz anschließt.



**Abb. 1 Genexpression von humanem TIP39 (modifiziert nach Hansen).** Zu sehen ist in der ersten Zeile die genomische Sequenz mit Sequenzen der Promotorregion, der TATA-Box und der Polyadenylierungssequenz in grauen Boxen. Schwarze Boxen zeigen Introns oder untranslatierte Bereiche an, weiße Boxen stehen für die Exons. In der zweiten Zeile ist die mRNA nach dem splicing zu sehen. Darunter finden sich die translatierten Proteinstrukturen, die eine typische Prozessierung eines sekretorischen Peptides durchlaufen: Abspaltung eines hydrophoben Signalpeptids (graue Box) und schließlich Spaltung des Zwischenpeptids (weiße Box) vom eigentlichen TIP39 (zweite graue Box).



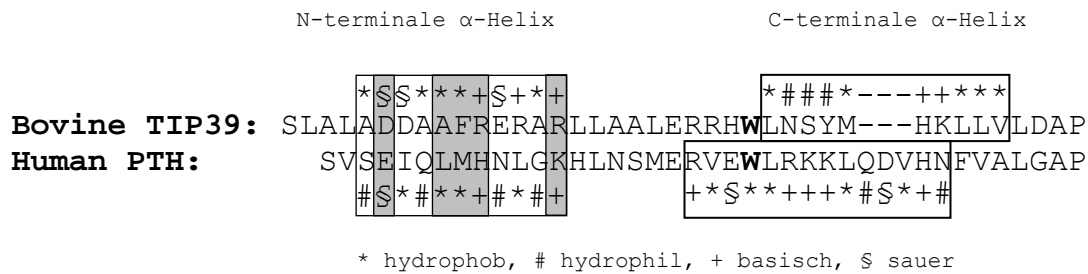
### 1.1.3 Strukturanalysen von humanem PTH und TIP39

Beim humanen PTH handelt es sich um ein Peptidhormon, das als N-terminal 31 Aminosäuren längeres Prepropeptid synthetisiert und nach Abspaltung von 26 Aminosäuren als ProPTH vom Endoplasmatischen Retikulum aufgenommen und nach Abspaltung der Pro-Sequenz gespeichert und sezerniert wird. Auch das humane TIP39, das zu 100% mit dem bovinen TIP39 übereinstimmt, wird als ein Preprohormon synthetisiert, wobei die ersten 30 Aminosäuren als Signalpeptid fungieren könnten. Es folgt ein etwa gleichlanges zwischengeschaltetes Peptid, das dem sezernierten TIP39 in der Sequenz vorgeschaltet ist<sup>9</sup>. Vergleicht man die Aminosäuresequenz von bovinem TIP39 und humanem PTH so ergibt sich eine nur geringe Sequenzhomologie<sup>10</sup> (lediglich 9 Aminosäuren sind identisch) bei einer dennoch hohen Ähnlichkeit von beinahe 50%, wenn man ähnliche Aminosäuren mit einbezieht.

**Bovine TIP39:** SLALADDAAFRERARLTAALERRHWLNSYM--FKLLVLDAP  
**Human PTH:** SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVENFVALGAP

**Abb. 2: Aminosäuresequenz von hPTH und bTIP39.** Es zeigt sich die geringe Übereinstimmung von nur neun gleichen Aminosäuren, die alleine die Gemeinsamkeiten bezüglich der Aktivierung des PTH2-Rezeptors schwer erklären könnte.

Trotz dieser geringen Übereinstimmung bezüglich der Aminosäuresequenz finden sich einige Gemeinsamkeiten, die die Aktivierung des PTH2-Rezeptors sowohl durch PTH, als auch durch TIP39 erklären können<sup>11</sup>. In Gegenwart von zwitterionischen Mizellen, die als Modell für Zellmembranen angesehen werden, finden sich sowohl beim TIP39, als auch beim humanen PTH (1-34) jeweils zwei  $\alpha$ -Helices (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Strukturvergleich von bovinem TIP39 und humanem PTH.** Die angenommenen  $\alpha$ -Helices sind in Boxen dargestellt. Hier sind im Gegensatz zur Abb. 2 die Aminosäuren nach ihrem Charakter als hydrophob, hydrophil, basisch oder sauer klassifiziert. Damit zeigt sich die große Übereinstimmung (grau hinterlegt) der N-terminalen  $\alpha$ -Helices von hPTH und TIP39. Zum anderen sind die C-terminalen  $\alpha$ -Helices gezeigt, in denen sich allerdings nur geringere Übereinstimmungen finden.

An den N-terminalen Enden finden sich ähnliche  $\alpha$ -Helices, deren große Sequenzhomologie eine zentrale Rolle bei der Rezeptorinteraktion andeuten könnte, sowie eine ähnliche Verteilung der geladenen Aminosäuren. Am C-terminalen Ende von TIP39 findet sich eine weitere  $\alpha$ -Helix, im Gegensatz zum PTH jedoch mit mehr geladenen Aminosäuren, was für die Interaktion mit dem langen extrazellulären N-Terminus des PTH2-Rezeptors und somit der größeren Selektivität für diesen Rezeptor verantwortlich sein könnte<sup>12</sup> (siehe auch 1.2.2)

### 1.1.4 Gewebeverteilung von TIP39

Umfassende Analysen der Gewebeverteilung von TIP39 wurden bisher v.a. in der Ratte mittels Northern Blot Analysen und *in-situ* Hybridisierungen mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen durchgeführt.

#### *Zentrales Nervensystem*

Die stärkste TIP39 Expression zeigte sich in der Area subparafascicularis und im Nucleus subparafascicularis, schwächere Expression fand sich in vielen Arealen des ZNS<sup>13</sup>.

#### *Pankreas*

Eichinger beschrieb hier den Nachweis von TIP39 Transkription, John hingegen fand nur eine Transkription in den Inselzellen des Pankreas, nicht aber im restlichen Pankreas.

### *Niere*

Es gelang sowohl der Nachweis von TIP39 Expression im Nierenparenchym, als auch in Nierengefäßen.

### *Hoden*

Hier konnte die stärkste Expression für die Tubuli seminiferi gefunden werden, wohingegen im Hodeninterstitium, beispielsweise den Leydig-Zellen, für die eine starke Expression des PTH2-Rezeptors bekannt sind, kein Nachweis von TIP39 gelang.

## **1.2 Der PTH2-Rezeptor**

### **1.2.1 Stellung in der Sekretin-Calcitonin-PTH-Rezeptorfamilie**

Der PTH2-Rezeptor wird einer bestimmten Familie von G-Protein gekoppelten Rezeptoren zugerechnet. Dieser gehört auch der PTH1-Rezeptor an, der vermittelt durch PTH an der Regulation des Calcium- und Phosphat-Haushaltes beteiligt ist und der weiterhin durch das PTHrP aktivierbar ist<sup>14</sup>, das sowohl eine physiologische Bedeutung in der Skelettentwicklung hat<sup>15,16</sup>, in verschiedenen Geweben wie Gefäßmuskelzellen, der Brustdrüse oder dem Pankreas in niedriger Dosis parakrin wirkt<sup>17</sup>, aber auch in hoher Konzentration paraneoplastisch auftritt und dabei Hyperkalziämien hervorruft<sup>18</sup>. Daneben wurden die Rezeptoren für Calcitonin<sup>19</sup>, Sekretin<sup>20</sup>, Glucagon vasoaktives intestinales Peptid (VIP), sowie verschiedene hypothalamische Releasing-Hormone dieser Familie zugeordnet. Die Sekretin-Calcitonin-PTH-Rezeptorfamilie wird häufig auch als Typ II oder als Klasse B Rezeptoren bezeichnet. Der PTH2-Rezeptor zeigt Sequenzhomologien von 52%, 42%, 40%, 37%, bzw. 33% zu den Rezeptoren für PTH, Sekretin, VIP1, VIP2 und Calcitonin. Diesen Rezeptoren ist gemeinsam, dass sie aus sieben die Zellmembran durchspannenden Domänen bestehen und zwei Second-messenger Kaskaden intrazellulär aktivieren können. So wird über ein stimulierendes G-Protein ( $G_s$ ) der cAMP/Adenylatzyklaseweg, sowie mittels  $G_q$  die Phospholipase C und somit der Inositoltrisphosphat/Proteinkinase C-Weg angeschaltet<sup>21</sup>.

### **1.2.2 Aktivierung und Signaltransduktion**

Für die Bindung des Liganden und die Aktivierung des PTH2-Rezeptors wird das so genannte „two-site model“ in Übertragung vom PTH1-Rezeptor angenommen<sup>22</sup>: Das C-terminale Ende des Liganden (PTH, TIP39) bindet mit dem N-terminalen Ende des Rezeptors (PTH2-Rezeptor), ferner findet eine schwächere Bindung des N-terminalen

Ende des Liganden mit einer juxtamembranen Domäne des Rezeptors statt, was mittels Konformitätsänderungen der Transmembrandomänen zur Aktivierung des Rezeptors führt. Durch die Konformitätsänderungen werden intrazelluläre Abschnitte des Rezeptors für G-Proteine zugänglich. Während für den PTH1-Rezeptor sowohl eine Aktivierung des cAMP/Adenylatzyklaseweges über ein stimulierendes G-Protein  $G_s$ <sup>23</sup> als auch eine Aktivierung des Inositoltriphosphat/Proteinkinase C-Weg über ein G-Protein  $G_q$ <sup>24</sup> beschrieben ist, wurde für den PTH2-Rezeptor nur eine Aktivierung des cAMP/Adenylatzyklaseweges gefunden.

### **1.2.3 Gewebeverteilung**

Nach der Klonierung des PTH2-Rezeptors wurde versucht, das Expressionsmuster des Rezeptors zu eruieren. Northern Blot Analysen mit humanen Geweben, *in situ*-Hybridisierungen<sup>25</sup> und Immunhistochemie bei der Ratte<sup>26</sup> ergaben folgende Gewebsexpression:

#### *ZNS*

Das ZNS ist die Region, in der die größte PTH2-Rezeptor Expression detektiert werden konnte. So wird er bei der Ratte über den gesamten Kortex verteilt und dem Striatum in kleinen Zellen exprimiert, doch auch im Septum, thalamischen Kernen und dem Hypothalamus konnte der Rezeptor nachgewiesen werden. Massive Expression zeigten die Eminentia mediana, oberflächliche Schichten des kaudalen Trigemini Traktes und die Hinterhörner des Rückenmarks.

#### *Pankreas*

Vor allem in der Peripherie der Inselzellen findet sich Expression des PTH2-Rezeptors, vor allem in Zellen, die auch Somatostatin produzieren, nicht jedoch in Insulinproduzierenden Zellen. Das exokrine Pankreas exprimiert nur in der Embryogenese sicher den PTH2-Rezeptor.

#### *Schilddrüse*

Auch hier liegt eine immunhistochemisch nachweisbare Expression des PTH2-Rezeptors besonders in parafollikulären Zellen vor, die gleichzeitig Somatostatin produzieren.

#### *Gastrointestinaltrakt*

Der PTH2-Rezeptor wird von Mucin-produzierenden Zellen der Magenschleimhaut exprimiert, sowie in Zellen des Plexus myentericus.

### *Herz-Kreislauf-System*

Im ganzen Herzkreislaufsystem wird der PTH2-Rezeptor stark exprimiert, in glatten Muskelzellen, im Endothel und auch in Herzmuskelzellen (siehe auch 1.3.4).

### *Blut*

In absteigender Reihenfolge wird der PTH2-Rezeptor auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten exprimiert, bei Hyperparathyreoidismus wird er auf Granulozyten herabreguliert<sup>27</sup>.

### *Knochen und Knorpel*

In Knorpelzellen, wie auch diffus im Knochen, besonders aber im sich entwickelnden Skelett ist eine Expression des Rezeptors nachweisbar, allerdings nicht in dem gleichen Ausmaß wie die des PTH1-Rezeptors.

### *Niere*

Am vaskulären Pol der Glomerula findet sich eine diskrete Zellpopulation, die den PTH2-Rezeptor exprimiert. Auch hier ist die Expression aber geringer als die des PTH1-Rezeptors.

## **1.3 Mögliche physiologische Funktionen des TIP39**

### **1.3.1 Neurotransmitter für die Nozizeption**

Aufgrund des Verteilungsmuster des PTH2-Rezeptors im gesamten ZNS, besonders in den Hinterhörnern des Rückenmarks, den sensorischen Spinalganglien und den korrespondierenden Abschnitten der Trigemini-Kerne in der Medulla, die die Zentrale der primären nozizeptiven Afferenzen darstellen, wurde die Rolle des TIP39 als postuliertem Liganden des PTH2-Rezeptors in der Sensorik von der Arbeitsgruppe von Ted B. Usdin untersucht<sup>28</sup>. Hierfür wurde männlichen Mäusen TIP39 intraplantar und intrathekal injiziert und die Schmerzreaktionen ermittelt. Daneben wurden verschiedene etablierte Schmerztest wie der Paw-pressure test („Pfoten-Druck-Test“), Tail-flick test („Schwanz-Zuck-Test“) oder der Hargreaves' test (thermischer Reiz auf die Hinterpfote) nach einer Vorbehandlung mit einem TIP39 Antikörper durchgeführt. Hierbei ließ sich sowohl bei intraplantaren, als auch bei intrathekaler TIP39 Injektion eine deutliche dosisabhängige Schmerzreaktion nachweisen. Bei den Versuchen, die Schmerzreaktion durch TIP39 Antikörper abzuschwächen, zeigte sich ein uneinheitliches Ergebnis, die Latenzen bis zum Eintritt einer Schmerzreaktion waren im

Tail-flick und im Paw-pressure test dosisabhängig verlängert, hingegen blieb der Hargreaves' test von der TIP39 Antikörper Injektion unbeeinflusst.

### **1.3.2 Modulation der Hypothalamus-Hypophysen Achse**

In der Arbeitsgruppe von SR Bloom wurde die Rolle von TIP39 in der Hypothalamus-Hypophysen Achse untersucht<sup>29</sup>, bewegt durch die starke Expression des PTH2-Rezeptors im Hypothalamus und Infundibulum. Hierfür wurden zum einen frische medial-basale Hypothalamus Präparate in TIP39 inkubiert und im Medium die Hormonsekretion von CRH (Corticotropin releasing Hormon), AVP (Arginin-Vasopressin), VIP (vasoaktives intestinales Peptid), GnRH (Gonadotropin-releasing Hormon), TRH (Thyrotropin-releasing Hormon), Somatostatin und GHRH (Growth hormone-releasing Hormon) gemessen. Hierbei ließ sich lediglich bei TRH und Somatostatin kein Anstieg nachweisen. Auch in vivo wurde ein Anstieg des ACTH (Adrenocorticotropes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) nach intraventrikulärer Injektion von TIP39 gemessen, aber kein Anstieg des GH (Growth hormone). Inkubation von Hypophysen Präparaten mit TIP39 führte zu keinem Anstieg der Hypophysenhormone im Medium.

### **1.3.3 Steuerung des Kalzium-Phosphat Haushalts**

Wie in 1.2.2 beschrieben, wirkt TIP39 am PTH1-Rezeptor als ein kompetitiver Antagonist, hingegen am PTH2-Rezeptor als der stärkste bekannte Agonist. Insofern ist eine Modulation des Kalzium-Phosphat Haushaltes möglich, wenn TIP39 in ausreichendem Maße in der Niere oder den Knochen exprimiert wird, also parakrin wirken kann, oder wenn es ins Serum sezerniert endokrin wirken kann. Da das PTH in nur geringen Konzentrationen im Serum vorliegt (zwischen 0.5 und 3 pM)<sup>30</sup>, könnten auch geringe Konzentrationen von zirkulierendem TIP39 am PTH1-Rezeptor die Wirkung von PTH antagonisieren. In der Niere ist eine Expression von TIP39 in renalen Gefäßen<sup>31</sup> und vom PTH2-Rezeptor juxtaglomerulär beschrieben worden. Auch in C-Zellen der Schilddrüse wurde der PTH2-Rezeptor gefunden. Diese exprimieren einen Calciumsensor und reagieren auf einen Anstieg des Serum-Calciums mit einer Sekretion von Calcitonin, welches die Osteoklasten-Aktivität und die Calcium Resorption aus dem Darm hemmt. Eine Co-Expression vom PTH2-Rezeptor und

diesem Calciumsensor könnte auf eine durch TIP39 modulierte Beeinflussung des Calcium Stoffwechsels hinweisen, ist aber noch nicht näher erforscht.

### **1.3.4 Vasodilatorische Effekte auf renale Gefäße**

In einer Arbeit der Arbeitsgruppe von Jeann-Jacques Helwig konnte die mRNA vom PTH2-Rezeptor und von TIP39 in renalen Gefäßen, der Aorta und in glatten Muskelzellen der Ratte, die aus renalen Gefäßen kultiviert wurden, nachgewiesen werden. In einem Modell der isolierten Niere konnte der Einfluss von bovinem TIP39 PTHrP und PTH auf die glatte Muskulatur und damit den Gefäßtonus simuliert werden. So führte eine Perfusion der isolierten Rattennieren mit 10 nM bovinem TIP39 zu einer Zunahme des Blutdrucks um 20%, Konzentrationen von 100 nM bzw. 1000 nM hingegen führten zu einer Abnahme des Blutdrucks um 10% bzw. 20%. Auch humanes PTH (1-36), Ratten PTHrP (1-34), sowie verschiedene PTH/PTHrP Hybride zeigten vasodilatorische Effekte. Da dies auch unter Bedingungen zutraf, in denen der PTH1-Rezeptor völlig herunterreguliert wurde, sind die Effekte wohl nicht über den PTH1-Rezeptor vermittelt, dessen vasodilatorisches Potential bekannt ist<sup>32</sup>. Allerdings konnte auch bezüglich der Blutdruckabfälle keine Interaktion mit dem PTH2-Rezeptor bewiesen werden.

### **1.3.5 Inhibition der Zellproliferation**

Ausgehend vom bekannten Einfluss von PTH auf die Zellproliferation<sup>33</sup>, wobei sowohl von hemmenden, als auch von steigernden Effekten berichtet wurde, wurden im GlaxoSmithKline Institut für Neurobiologie, Mailand, Untersuchungen zur Wirkung von TIP39 und hPTH(1-34) auf die Zellteilung mit HEK293 Zellen durchgeführt<sup>34</sup>. Ein Biolumineszenz-Assay wurde zur Messung der Zellzahl herangezogen. Hierbei zeigte sich bei Inkubation der Zellen mit 100nM hPTH(1-34) bzw. TIP39 eine nach drei bzw. vier Tagen maximale, 35% bzw. 30% betragende Inhibition der Zellproliferation. Eine Zytotoxizität konnte dabei ausgeschlossen werden. Diese Effekte konnten durch Zugabe des PTH2-Rezeptor Antagonisten b[D-Trp12, Tyr34] PTH(7-34) aufgehoben werden. Des Weiteren wurde eine Dosisabhängigkeit dieses Effekts gezeigt. Den zwiespältigen Charakter des Einflusses des PTH auf die Zellproliferation erklärten die Autoren durch die unterschiedliche Expression entweder des PTH1-Rezeptors oder des PTH2-Rezeptors in verschiedenen Zellpopulationen.

### **1.3.6 Negative Inotropie am Herzen**

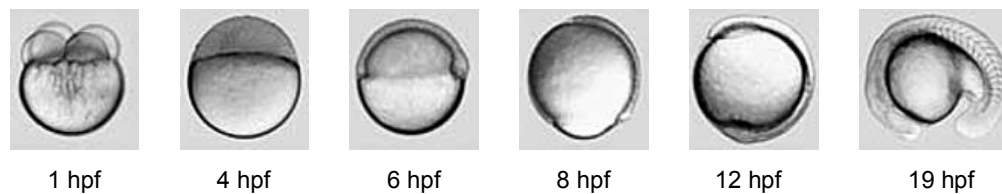
An der Giessener Universität wurde der Effekt von TIP39 auf die Kontraktilität des Herzens untersucht<sup>35</sup>, basierend auf den Ergebnissen, dass TIP39 an der Niere vasodilatierend wirkt. Hierzu wurden isolierte Rattenherzen und ein Modell mit elektrisch stimulierten Einzelzellen verwendet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass 100nM TIP39 den LVDP (Differenz zwischen linksventrikulär endsystolischem Druck und linksventrikulär enddiastolischem Druck) um 8% senken konnte, in Anwesenheit von 100µM Noradrenalin sogar um 35%. Dieser Effekt ließ sich durch PTH1- und PTH2-Rezeptor-Antagonisten aufheben. Ebenso konnte im Einzelzell Experiment eine Abnahme der Verkürzungsfraction gemessen werden, auch unter Noradrenalin deutlich stärker als ohne. Ein vasodilatatorischer Effekt auf die Koronarien konnte allerdings nicht beobachtet werden. Zum anderen wurde ein Anstieg des intrazellulären cGMP unter TIP39 Perfusion festgestellt, was eine Signalkaskade über den NO-Weg vermuten lässt. Ein Anstieg des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>, als Endstrecke der cAMP und IP3-Wege hingegen wurde nicht detektiert.

### **1.4 Der Zebrafisch als entwicklungsbiologisches Modell**

Der Zebrafisch *Danio rerio* wurde 1822 erstmals beschrieben, er stammt ursprünglich aus den Zuflüssen des Ganges in Bengalen, Nepal, Pakistan und Bangladesh. Er bevorzugt stehende Gewässer und lässt sich im Aquarium einfach halten. Seit den ersten Experimenten von George Streisinger und Charles Kimmel in den frühen 1970er Jahren wurde der Zebrafisch neben *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* oder *Xenopus laevis* zu einem beliebten entwicklungsbiologischen Modell. Als Vertebratenmodell stellt er eine gute Alternative zu der Maus dar, ist dabei aber deutlich einfacher und kostengünstiger zu halten. Die Vorteile des Zebrafisches liegen in der kurzen Generationenzeit (er erreicht die Geschlechtsreife nach etwa 16 Wochen), in der guten Verfügbarkeit einer großen Zahl von Nachkommen (ein Weibchen kann pro Woche etwa 300 Eier ablaichen) und in der Entwicklung des Eis völlig außerhalb des Muttertieres, was zusammen mit der Transparenz während der Entwicklung eine gute Beobachtung der Organogenese erlaubt. Des Weiteren lässt die Größe von 5 cm auch Transplantationsexperimente zu. Zudem sind ca. 85% der menschlichen Gene auch im Zebrafisch vorhanden, sodass beispielsweise auch genomische Mutationsanalysen einfach durchzuführen sind. Da der Zebrafisch ein Wirbeltier ist, lassen sich gerade



auch Experimente zur Entwicklung der Knochen und Knorpel gut studieren. Mittels Injektion von Oligonukleotiden, die genspezifische mRNA binden und somit die Translation verhindern, der so genannten Morpholino-Knockdown Methode (siehe auch 3.7), lassen sich einfach Genprodukte in der Entwicklung herunter regulieren und daraus ein grober Hinweis auf die Funktion des Gens erhalten. Die Entwicklung nach der Befruchtung des Eis läuft in kürzester Zeit ab: Bereits nach 12 Stunden sind Kopf und Schwanz erkennbar, die Segmentierung des Achsenskeletts ist beobachtbar und nach 24 Stunden schlüpfen die Larven. Auch bei der Erforschung der Hirnentwicklung wurde der Zebrafisch zu einem häufig benützten Modell. Insbesondere die Ausbildung axonaler Netzwerke bei der Neurogenese kann im Zebrafischhirn gut beobachtet werden.



**Abb. 4: Stadien der Zebrafiscentwicklung nach der Befruchtung.** Man sieht die rasche Entwicklung der Zebrafischlarven in Stunden nach der Befruchtung (hpf). Gezeigt sind von links nach rechts das Vier-Zell-Stadium, das sphere Stadium, das shield stadium, das 75%-epiboly Stadium, das 3-somite Stadium und das 18-somite Stadium, indem bereits das Auge, der Kopf, der Schwanz und die Gliederung des Achsenskeletts in Somiten. Adaptiert nach Kimmel et al. 1995<sup>36</sup>.

### 1.5 Fragestellung

Wie aus den Abschnitten 1.3.1 bis 1.3.6 hervorgeht, ist bezüglich einer möglichen physiologischen Funktion von TIP39 bisher nur sehr wenig bekannt. Vielmehr stellen die bisher gemachten Mutmaßungen meist nur Einzelarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen dar, ein klarer Trend, worin die Funktion bestehen könnte, ist hieraus nicht zu erkennen. Eine Funktion im ZNS erschien jedoch aufgrund des dort auch erstmals gelungenen Nachweises sehr wahrscheinlich, sodass die erste Zielsetzung dieser Arbeit eine genauere Kartierung von TIP39 im Mäusehirn darstellt. Für das murine TIP39 war uns im Vorfeld eine genaue Charakterisierung des Gens gelungen.

Die zweite Fragestellung widmet sich dem TIP39 im Zebrafisch. Hierfür soll das für das Zebrafisch TIP39 kodierende Gen genau beschrieben werden, die genomische

Lokalisation geklärt werden, die die Prozessierung zum eigentlichen TIP39 beschrieben werden, die Stadien-spezifische Expression ermittelt werden sowie weitere funktionelle Experimente gebahnt werden, um so rasch einen umfassenden Überblick über die TIP39 Expression in einem ganzen Organismus zu bekommen.

## 2 Material

### 2.1 Materialien tierischer Herkunft

Für Gewebeentnahmen wurden erwachsene CD-1 Mäuse von Charles River Breeding Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter Standardbedingungen gehalten mit einem 12h Licht – 12h Dunkelheit Zyklus.

Die Zebrafische vom Wildtyp wurden von der Arbeitsgruppe von Christoph Winkler, Institut für Physiologische Chemie I, Universität Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie wurden bei 28°C gehalten nach Protokollen von Kimmel (1995)<sup>36</sup>. Embryonen wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien gesammelt und in 4% Paraformaldehyd in PBST für die *in-situ Hybridisierungen* fixiert.

### 2.2 Bakterien

XL1-Blue

Stratagene, Heidelberg

Genotyp:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$   
 $173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$   
 [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (TetR)].

One Shot® TOP 10F'

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Genotyp: F' {*traΔ36 proAB lacIq lacZΔM15*}  
*rpsL* (StrR) *thr leu endA thi-1 lacY galK galT*  
*ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB)*  
 $\Delta(mcrC-mrr)102:Tn10$  (TetR)

### 2.3 Vektoren

pCR®II-TOPO

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.4 Enzyme

T4-DNA Ligase

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Proteinkinase K

Sigma-Aldrich, Steinheim

HotStar Taq DNA Polymerase

Qiagen, Hilden

Herculase DNA Polymerase

Stratagene, Heidelberg

Restriktionsendonukleasen:

EcoRI            5'-G↓AATTC-3'  
                     3'-CTTAA↑G-5'

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

BamHI           5'-G↓GATCC-3'

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

	3'-CCTAG↑G-5'	
HindIII	5'-A↓AGCTT-3' 3'-TTCGA↑A-5'	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
NotI	5'-C↓GGCCG-3' 3'-GCCGG↑C-5'	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 2.5 Antikörper

Anti-Dig-AP	1:500 verwendet	Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, USA
-------------	-----------------	--

### 2.6 Kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller	Anwendung
QIAprep Spin Miniprep Kit (Enthält: Puffer P1-P3 und PE)	Qiagen GmbH, Hilden	Extraktion von Plasmiden aus E.coli-Bakterien.
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) (Enthält: NTP labeling mixture, Transkription buffer, RNase inhibitor, DIG-labeled control RNA und RNA Polymerase T7 oder SP6)	Roche Diagnostics GmbH, Indianapolis, USA	Herstellung Digoxigenin- markierter RNA-Sonden.
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Klonierung von DNA-Frag- menten in den pCSII-Vektor
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden	Durchführung von Reverse- Transkription-PCRs
QIApolyA+ Kit	Qiagen, Hilden	Extraktion von mRNA aus Total-RNA
Trizol-Reagenz.	Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Gewinnung von RNA aus Gewebeproben
Montage Gel Extraction Kit	Millipore GmbH, Schwalbach	Extraktion von DNA Banden aus Elektrophoresegelelen
SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg	Verlängerung einer bekannten cDNA in 3'- bzw. 5'-Richtung (RACE-PCR)

### 2.7 Chemikalien

Für die hier beschriebenen Experimente wurden Feinchemikalien in p.A. Qualität der Firmen Boehringer (Mannheim), Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim) verwendet.

### 2.8 Lösungen und Puffer

LB-Medium (Luria-Bertami Medium)	10 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 1 l H <sub>2</sub> O gelöst, mit NaOH auf einen pH von 7,0- 7,5 eingestellt und anschließend autoklaviert.
LB-Amp-Platten	Zu 1 l LB-Medium wurden vor dem Autoklavieren 10g Agar gegeben, danach 1 ml Ampizillin-Stammlösung zugegeben und nach kurzem Abkühlen Gießen in Petrischalen.
X-Gal-Platten	LB-Amp-Platten wurden mit 40 ml einer X-Gal Stammlösung (20 mg/ml in DMF) und 4 ml einer IPTG-Stammlösung (200 mg/ml in H <sub>2</sub> O) mit einem Drigalski-Spatel auf der Oberfläche der Platten überzogen. Die Platten wurden ca. 4 h bei 37°C getrocknet.
Ampizillin-Stammlösung (50mg/ml)	500 mg Ampizillin wurden in 10 ml H <sub>2</sub> O gelöst und steril filtriert. Bei -20°C lagerbar. Verwendung ca. 1:1000.
Lysispuffer	1,2 ml 5 M NaCl, 6 ml 0,5 M EDTA, 0,3 ml 20% SDS, 0,3 ml Proteinase K wurden mit 22,2 ml ddH <sub>2</sub> O zu 30 ml Lysispuffer.
Joule-Box Puffer	24 g Tris, 37 g EDTA und 5,7 ml Essigsäure wurden mit 5 l ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt.
SOC Medium	20 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefe-Extrakt und 0,5 g NaCl wurden in 950 ml ddH <sub>2</sub> O gelöst. Zugabe von 10 ml einer 250 mM KCl-Stammlösung, Einstellung des pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt. Autoklavieren zur Sterilisierung. Nach Abkühlung auf 60°C Zugabe von 10 ml 1M Glukoselösung. Steriles Filtrieren mit 0,22 µm Filter. Lagerung bei -20°C.
RNA Delution Buffer	Mischung aus ddH <sub>2</sub> O : 20xSSC : Formaldehyd in einem Verhältnis von 5:3:2.
4%PFA	4 g Paraformaldehyd wurden in 100 ml PBS unter dem Abzug erwärmt bis das Paraformaldehyd vollständig gelöst war.
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . pH-Einstellung auf 7,4-7,6.
Glycinpuffer	0,1 M Glycin, 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0).
Triton-X-Puffer	0,3% Triton-X in PBS.
Postfixationspuffer	0,1 M TEA, 0,25% Essigsäureanhydrid.

## Material

---

Prähybridisierungslösung	50% Formamid, 50% 4xSSC.
Hybridisierungslösung	40% Formamid, 10 mM DDT, 1mg/ml Hefe t-RNA, 0,1 mg/DL sssSS-DNA, 10% Dextransulfat. Bei -20°C gelagert. Sonde und sssSS-DNA wurden immer frisch zugesetzt.
20xSSC	3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat , pH 7,0.
TBS	10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,4.
Absättigungslösung	TBS, 0,1%Triton-X, 2% Schaf-Serum.
Detektionspuffer	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5.
Färbelösung	NBT (66 µl), BCIP (33 µl) in 10 ml Detektionspuffer, frisch angesetzt.
Depurinisierungslösung	0,25 N HCL.
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.
Neutralisierungslösung	1 M Tris-Cl, pH 7,0, 1,5 M NaCl .
DIG Puffer 1	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5.
DIG Puffer 2	DIG Puffer 1 + 1% Blocking Reagenz (Roche).
DIG Puffer 3	100 mM Tris-Cl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> .

## 2.9 Nukleinsäuren

sssSS-DNA (Lachsspermien DNA)	Sigma, Steinheim
dNTP-Mix 10 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
drTIP39-spezifische Morpholino-Oligonukleotide (Sequenz:CTCTGCTAAGATGGCTTTGTCCTTG)	Gene Tools, Philomath, USA

## 2.10 Synthetische Polynukleotide

Sämtliche unten genannte Oligonukleotide wurden von Thermo Hybaid, Ulm synthetisiert.

Name	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub>	%GC	Länge
mTIP39_METCQ	ATG GAG ACC TGC CAG ATG TCC AGG AGC CCC	73,4°C	63,3%	30
mTIP39_polyA+1	AGG CGC AGT CGC AGT GCG ACA	73,1°C	69,3%	26

## Material

---

	GGC TC			
mTIP39_TATA+30	CTG CAC GGT AGG GGG TCC TGT AGG AGG CTG G	73,9°C	67,7%	31
mTIP39-mitte	TGT GTT CAG CCT CCG CGC CCC GGG T	75,9°C	72,0%	25
drTIP39_gen_5'	GTC AGA ACA GCA CTA GTC AGA AGG CTC GCT C	66,2°C	54,8%	31
drTIP39_gen_3'	GGG CTT AGG GAA TTG AAT CGA TTA GCT GCG C	70,0°C	51,6%	31
TIP39_rerio_RACE	TTG AAT TAA CTA CTA AGA GCT TCT GCA TAT AGG AGT TGA GCC ATT T	68,8°C	34,8%	46
TIP39_fugu_RACE	CTG AAT TAA CCA CCA GAA GTT TCT GCA TGT AGG AGT TCA GCC A	73,9°C	44,2%	43
TIP39_homo_RACE	GCG CAT CCA ACA CCA GCA GCT TGT GCA TGT A	73,7°C	54,8%	31
drTIP39_1(f)	AGT CAA GAG GAA GAA CTA CTC TGC TAA GAT GGC TTT GTC CTT	69,8°C	42,9%	42
drTIP39_2(r)	TTA CTT TGA ATT AAC TAC TAA GAG CTT CTG CAT ATA GGA GTT GAG CCA	69,2°C	35,4%	48
drTIP39_3(f)	TAA CTT GCC TGC AAT TGG TCA AGA AGA CTC CAA AGG T	71,0°C	43,2%	37
drTIP39_4(r)	GTC AAC AGC TTA CTC TTC TCT CTA AAC GCA GCG TCA TCT	69,9°C	46,2%	39

## 2.11 Geräte

-80°C-Gefrierschrank	Forma Scientific, -86C Freezer	Genheimer Kälte-Klima-Technik GmbH, Hettstadt
Autoklav	FVSI1	Integra Biosciences, Tecnomara Deutschland GmbH, Fernwalde
Bakterien-Brutschrank	TM30/SM30	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen
Elektrophoresekammer	Model H5	Gibco BRL, Gaithersburg, USA
Elektrophoresekammer	Joule Box™ System	Stratagene, Heidelberg
Elektroporator	EasyjecT Prima	EquiBio, UK
Feinwaage	SBA 32	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Feinwaage	572-35	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Heizblock	Dri-Block® DB-20	Techne, Cambridge, UK
Hybridisierungsöfen	AutoBlot®	Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA
Kippschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Kehlheim
Kryotom	Jung CM 3000	Leica, Bensheim
Magnetrührer heizbar	M35	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Mikroinjektor	Microinjector 5242	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	DM IL	Leica, Bensheim
Netzgerät	Power Pac 300	BioRad, USA
pH-Meter	pH 526 Multi Cal®	WTW, Weilheim
Pipetten-Auszieher	KOPF Modell 720	Zum Ausziehen von Glaskapillaren (Durchmesser innen 0.58, außen 1.0 mm).
Spektralphotometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Standzentrifuge	Rotanta 96RC	Hettich, Tuttlingen
Taumelinkubator	RS-60 Tube Rotator	Bio-San
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Heraeus Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products, Osterode
UV-Kammer	GS Gene Linker™	BioRad, Richmond, USA
UV-Tisch	UV Transluminator	International Biotechnologies Inc., New Heaven, Conneticut, USA
Vortexer	Reax 1 Dr	Heidolph, Kehlheim
Wasserbad	WB7	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach



### **3 Methoden**

#### **3.1 Molekularbiologische Grundlagenmethoden**

##### **3.1.1 Vermehrung von Bakterien mittels Übernachtskultur**

Die Übernachtskultur eignet sich zur Vermehrung von E.coli-Bakterien im Flüssigmedium. Hierzu wurde mit einer Einmal-Impföse von Bakterienplatten eine Kolonie gepickt oder von einer bei -80°C gefrorenen Glycerinkultur eine Öse voll von oben abgekratzt und die Impföse in ein 50ml-Tube getaucht, in dem 10 ml LB-Medium und 20 µl Ampicillin einer Konzentration von 50 mg/ml vermischt wurden. Die Kulturfläschchen wurden bei 37°C über Nacht mit ca. 200 rpm geschüttelt.

##### **3.1.2 Anlegen einer Glycerinkultur**

Um eine Bakterienkolonie für mehrere Jahre stabil konservieren zu können, legt man eine Glycerinkultur an. Es werden 1000 µl einer Mischung von Kulturmedium und Bakterien aus einer Übernachtskultur mit 500 µl 86%igen steril filtrierten Glycerin in einem 1,5ml-Tube gründlich vermischt. Die Tubes wurden bei -80°C weggefroren und so sind die Bakterien bei Bedarf über mehrere Jahre hin durch Übernachtskultur wieder vermehrbar.

##### **3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA**

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus E.coli-Bakterien wurde der kommerzielle Kit MiniPrep von Qiagen benutzt. Es wurden 10ml-Übernachtskulturen bei 3000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand an Nährmedium wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Überführung in ein 1,5ml-Tube wurde 250 µl des alkalischen Lysispuffer P2 und 350 µl von Neutralisationspuffer P3 hinzugefügt, wodurch die genomische DNA der E.coli-Bakterien bei leichtem Invertieren ausfiel, hingegen die zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung blieb. In der Lösung blieben des weiteren Protein-SDS-Komplexe, die zusammen mit der genomischen DNA durch zehnmütige Zentrifugation bei 13.000 rpm an den Boden der Tubes pelletiert wurden. Der Überstand wurde durch Dekantieren in eine Qiagen MiniPrep-Säule überführt. Diese Säulen binden pufferabhängig als Anionenaustauscher die geladene Plasmid-DNA, wodurch Verunreinigungen gewaschen werden können und die hochreine Plasmid-DNA reeluiert werden kann. Hierzu wurde nach dem Dekantieren zuerst für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss im Auffang-Tube verworfen,

mit 750 µl Puffer PE aufgefüllt, nochmals bei 13.000 rpm zentrifugiert, wiederum der Durchfluss verworfen und nach einminütiger Trocknungszentrifugation bei 13.000 rpm die Säule auf sterile 1,5ml-Tubes übergesetzt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl ddH<sub>2</sub>O und nochmalige Zentrifugation mit 13.000 rpm eluiert.

### **3.1.4 Isolation von Total-DNA aus Geweben**

Um aus einer Gewebeprobe hochmolekulare DNA zu gewinnen, verwendeten wir einen Lysispuffer. Die Gewebeprobe und die fünffache Menge an Lysispuffer wurden in einem Glashomogenisator vorsichtig verkleinert, bis eine trübe, homogene Suspension entstand, die in 1,5ml-Tubes umgefüllt wurde. Diese wurde 3 Stunden bei 80°C inkubiert, wobei die Tubes alle halbe Stunde invertiert wurden. Nach dem Abkühlen wurde ein halbes Volumen an Phenol zugegeben und 15 Minuten auf dem Taumelschüttler inkubiert. Es folgten die Zugabe der gleichen Menge an Chloroform, wie vorher an Phenol und ebenso eine 15minütige Inkubation auf dem Taumelschüttler. Dann wurde 10 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert, die wässrige Phase abgezogen und mit einem gleichen Volumen an Chloroform versetzt wiederum 15 Minuten taumelnd inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren bei 2.500 rpm wurde erneut die wässrige Phase vorsichtig abgezogen, mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und gemischt. Die sichtbar werdende hochmolekulare DNA wurde dann mit einer Glaskapillare, deren Spitze zu einem Haken zugeschmolzen wurde, herausgefischt, in 70%igem Ethanol gewaschen und in ein Tube mit einer geeigneten Menge an ddH<sub>2</sub>O getaucht. Die Glaskapillare wurde solange in dem Tube belassen, bis die DNA ganz vom Glas gelöst war, in der Regel nach ca. einer Stunde. Dann wurden die Tubes über Nacht bei 4°C inkubiert, so dass sich die DNA restlos lösen konnte und dann spektralphotometrisch die Konzentration bestimmt.

### **3.1.5 Isolation von mRNA aus Geweben**

Bei der Gewinnung von RNA aus Geweben ist es wichtig, streng RNase-frei zu arbeiten und die Verarbeitung direkt nach der Entnahme des vitalen Gewebes zu beginnen, damit keine der körpereigenen RNasen zu arbeiten beginnen. Wir benutzten zur Total-RNA-Gewinnung das Trizol<sup>®</sup>-Reagenz. Hiervon wurden 1 ml mit je 100 mg Gewebe in einem Glashomogenisator homogenisiert. Nach 5minütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm wurde der wässrige Überstand vorsichtig abgezogen und mit einem gleichen Volumen

an Chloroform auf dem Taumelschüttler für 10 Minuten inkubiert, anschließend 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und wiederum die wässrige Phase abgezogen. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis die wässrige Phase nicht mehr nach Phenol riecht. Dann wurde die Total-RNA mit zweifachem Volumen an Isopropanol über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für mindestens 60 Minuten gefällt. In der Kühlzentrifuge wurde dann 30 Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgezogen, mit 70%igem Ethanol das Pellet gewaschen und nochmals für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wird das Ethanol vom Pellet abgezogen, dieses trocknen gelassen und in einer geeigneten Menge ddH<sub>2</sub>O gelöst. Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  ist die RNA lange Zeit stabil. Um nun aus der Total-RNA die reinen mRNAs herauszufiltern, verwendeten wir den Qiagen-Kit QIApolyA<sup>+</sup><sup>®</sup>. Dieser beruht auf der Tatsache, dass alle Messenger-RNAs am 3'-Ende einen Polyadenosinschwanz aufweisen. Die im Kit enthaltenen Säulchen weisen nun Poly-Thymidin-Strukturen auf, an die die mRNAs unter bestimmten Milieubedingungen binden. Somit können sie von den restlichen RNA-Fragmenten getrennt werden, und nachher wieder aus den Säulen eluiert werden.

### 3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

Um zirkuläre Plasmid-DNA zu linearisieren oder um DNA an einer bestimmten Stelle zu teilen, wurden Restriktionsverdau durchgeföhrt. Je nachdem, ob ein glattes Ende („blunt ends“) der beiden doppelsträngigen DNA-Fragmente oder DNA-Fragmente mit überlappenden Enden („sticky ends“) erzeugt werden sollen, können verschiedene Restriktionsendonukleasen zum Einsatz kommen. Dies sind bakterielle Enzyme, die die Hydrolyse der Doppelstrang-DNA katalysieren. Die zugehörigen Schnittmuster der Enzyme, oft werden Pallidrome erkannt, sind im Abschnitt Material dargestellt. Um gut zu arbeiten, brauchen die Enzyme ein bestimmtes Ionenmilieu, was durch zugehörige Puffer gewährleistet wird. Diese Puffer werden stets in 10fach konzentrierter Form geliefert. Die Menge Enzym, die 1  $\mu\text{g}$  DNA in einer Stunde spaltet, wird mit 1 Unit (U) angegeben. Meist wurden 100 $\mu\text{l}$ -Ansätze verwendet, wobei 70  $\mu\text{l}$  wässriger DNA-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  Puffer mit 10  $\mu\text{l}$  Enzym in einem 1,5ml-Tube vermischt und im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 2 Stunden verdaut wurden. Die DNA-Menge wurde so gewählt, dass der in den 10  $\mu\text{l}$  Enzym enthaltene Wert an Units mit der DNA-Menge in  $\mu\text{g}$  übereinstimmt. Zum Stoppen des Verdau wurde auf  $65^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten erhitzt und somit die Enzyme inaktiviert.

### 3.1.7 Fällung von DNA

Für die genaue Konzentrationsanpassung an die Vorgaben eines Experiments ist es oft nötig, eine höher konzentrierte DNA-Lösung einzusetzen, als man durch vorige Experimente erhalten hatte. Es ist also nötig, die DNA mit 10% 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 200% Ethanol zu fällen. Die Löslichkeit der DNA ist in Anwesenheit der Na<sup>+</sup>-Ionen gering, da diese zusätzlich mit der DNA um die Hydrathüllen konkurrieren. Bei -70°C genügt eine Inkubation von einer Stunde, bei -20°C muss über Nacht inkubiert werden, ehe das DNA-Präzipitat mit 13.000 rpm für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert und dann vorsichtig der Überstand an Ethanol abgezogen werden kann. Daraufhin kann durch entsprechende Zugabe von ddH<sub>2</sub>O die DNA-Konzentration in der Lösung neu bestimmt werden.

### 3.1.8 Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung von DNA

Oft ist es nötig, DNA nach einem Reaktionsschritt, z.B. nach einem enzymatischen Verdau, für den nächsten Reaktionsschritt zu reinigen. Ansonsten könnten die Puffer, Enzyme oder andere Hilfsstoffe aus dem ersten Schritt, den zweiten behindern. Für eine solche DNA-Reinigung eignet sich die Phenol/Chloroform-Extraktion. Diese basiert auf dem Phänomen der Phasentrennung. Es wurde die DNA-Lösung mit einem gleichen Volumen an Phenol für 5 Minuten im Taumelschüttler ausgeschüttelt, hierauf wurden in einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm die Phasen wieder getrennt, die wässrige Phase, die auch die DNA enthält, mit einer feinen Pipette vorsichtig abgezogen und in ein neues 1,5ml-Tube gegeben, die organische Phase, in der sich Enzyme und andere Verunreinigungen abgesetzt haben, wurde verworfen. Daraufhin wurde ein gleiches Volumen an Chloroform zugegeben, wieder 5 Minuten im Taumelschüttler ausgeschüttelt, bei 13.000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde die wässrige Phase vorsichtig abgezogen und in ein neues Cap umgefüllt, in welchem die DNA nun gereinigt vorlag. Wenn die Lösung noch nach Phenol roch wurde der Chloroform-Schritt wiederholt. Anschließend wurde die Lösung wie in 3.1.7 beschrieben mit Ethanol gefällt.

### 3.1.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Es wurde die zu bestimmende Lösung im Verhältnis 1:69 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm die Absorption abgelesen,

nachdem man vorher das Gerät mit einer Messung des reinen Verdünnmediums auf einen Nullwert der Absorption geeicht hatte.

### **3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

DNA-Fragmente zu verbinden ist ein häufig auftretendes Problem in der Molekularbiologie. So sollen etwa PCR-Fragmente in einen Vektor eingefügt werden. Wir verwendeten hierfür die T4-Ligase. Dieses Enzym kann vor allem „sticky-end“-DNA-Fragmente zusammenfügen. Wichtig ist, eines der beiden Fragmente vor der Ligation zu dephosphorylieren. Für die Reaktion wurde ein Ansatz von 10 µl verwendet, wobei 1 µl T4-Ligase, 1 µl 10x Ligase-Puffer, je 200 ng der beiden DNA-Fragmente und ddH<sub>2</sub>O auf 10 µl Gesamtvolumen eingesetzt wurden. Die Ligation fand bei konstant 16°C über Nacht im Thermocycler statt. Beendet wurde die Reaktion durch Erhitzen des Ansatzes auf 65°C für 15 Minuten.

### **3.1.11 Transformation von Plasmiden in Bakterienzellen**

Von dem Ansatz der Ligation kamen 2 µl zum Einsatz. Diese wurden zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot elektrokompetenter XL1-Blue Zellen pipettiert, 2 Minuten auf Eis inkubiert und in eine ebenso auf Eis vorgekühlte Küvette (Wand-zu-Wand-Dicke 2 mm) gefüllt. Es folgte ein 5 ms langer Spannungsschoss von 1500 V im Elektroporator. Unmittelbar danach wurde 1 ml SOC-Medium hinzupipettiert und das Ganze in einem 1,5ml-Cap für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden 50 µl hiervon auf einer geeigneten Selektionskulturplatte (enthält ein Antibiotikum, für das es im Vektor eine Resistenz gibt) ausgestrichen und über Nacht wachsen gelassen. Alle vorgefundenen Kolonien enthielten das Plasmid, da sie sonst wegen des Antibiotikums in den Platten nicht hätten wachsen können.

### **3.1.12 Vermehrung von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie und wurde 1984 von Kary Mullis entwickelt. Sie ermöglicht es, eine bekannte DNA-Sequenz ausgehend von einer Matrize (z.B. genomischer DNA) exponentiell zu vervielfältigen. Es wird die Matrizen-DNA (auch Template-DNA genannt) durch Erhitzen auf eine Denaturierungstemperatur von 96°C in die beiden komplementären Stränge geteilt, nach einer Abkühlung auf eine Annealingtemperatur

von 50°C – 65°C wird ein Gemisch aus zwei einzelsträngigen, synthetischen Oligonukleotiden, die zum 5'-Ende bzw. 3'-Ende der Zielsequenz komplementär sind (sog. Primer) zugefügt. Diese hybridisieren an die komplementäre Sequenz in der Matrize. Eine zugegebene DNA-Polymerase fängt nach Aufwärmen auf eine Elongationstemperatur von 72°C an, die Einzelstränge ausgehend von diesen Hybriden vom 5'- zum 3'-Ende wieder zu Doppelsträngen zu vervollständigen. Hier beginnt der zweite Durchgang mit erneutem Aufwärmen auf 96°C und Trennen der nun bereits zwei Exemplare der Doppelstrang-DNA. Die theoretische Anzahl der Kopien von  $2^n$  Exemplaren nach  $n$  Zyklen wird praktisch allerdings nur zu ca. 70% erreicht. Der Durchbruch der Methode gelang, als man eine hitzestabile DNA-Polymerase entdeckte und somit nicht mehr nach jedem Zyklus die Polymerase neu hinzugefügt werden musste.

Die in unseren Experimenten verwendeten Primer wurden von der Firma Thermo Hybaid, Ulm synthetisiert, bei der Längenwahl (BZ) richteten wir uns nach dem GC-Gehalt (%GC) der Primer und nach der errechneten Schmelztemperatur ( $T_m$ ) dieser Primer, die nach der Formel

$$T_m = 67,5 + 0,34 \times (\%GC) \times \frac{395}{BZ}$$

errechnet wurde. Die Annealingtemperatur sollte ca. 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen. Es wurden die DNA-Polymerasen HotStar Taq DNA Polymerase der Firma Qiagen und die Herculase der Firma Stratagene verwendet, wobei die Herculase bei der Klonierung von langen Zielsequenzen zum Einsatz kam, wenn die Zahl der falsch eingebauten Nukleotide möglichst gering gehalten werden sollte. Wurde die PCR jedoch eingesetzt, um lediglich das Vorhandensein der Zielsequenz in der eingesetzten Matrizen-DNA nachzuweisen, genügte auch die Genauigkeit der Taq-Polymerase. Beachtet werden muss, ob das verwendete Enzym bereits beim Zupipettieren zu arbeiten beginnt, oder ob dafür eine bestimmte Temperatur für eine bestimmte Zeit erforderlich ist (sog. hot start). Die Reaktionen wurden in 200µl-Tubes durchgeführt, deren geringe Wanddicke eine gute Wärmeübertragung vom Metallblock des Cyclers ermöglichte. Es wurden 5 µl Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mmol/ je 2,5mmol), 1 µg DNA-Template, 6 µl Primermix (1:1 Mix aus dem 5'- und 3'-Primer, jeweils 10nmol), 1 µl Enzym und ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl Gesamtvolumen zusammenpipettiert. Das verwendete Programm für den Thermocycler gestaltete sich folgendermaßen: Nach dem initialen Denaturierungsschritt von 96°C für 45 Sekunden folgte ein Annealingschritt bei der

errechneten Temperatur für weitere 45 Sekunden und dann ein Elongationsschritt bei 72°C für eine Zeit, die von der Länge der Zielsequenz abhängt. Die DNA-Polymerasen schaffen es, in 2 Minuten ca. 1000 Basen zu polymerisieren. Diese drei Schritte wurden nun etwa 25–40 mal wiederholt, worauf ein terminaler Elongationsschritt bei 72°C folgte, in welchem die restlichen DNA-Fragmente noch ergänzt werden konnten. Bei schlechter Ausbeute der PCR können an der  $Mg^{++}$ -Konzentration, den Temperaturen, der Elongationszeit und der eingesetzten DNA-Matrizen-Menge Abänderungen vorgenommen werden.

### **3.1.13 Gelelektrophorese mit Agarosegelen und Isolation von DNA-Banden**

Zur Auftrennung von einem DNA-Gemisch in seine verschiedenen Fragmente verwendet man die Methode der Gelelektrophorese. Hierbei wird die negativ geladene DNA in einem Gel, das aus Agarose besteht, welche ein feinporiges Gitterwerk bildet, in einem elektrischen Feld, nach der Größe und Ladung der Fragmente aufgetrennt. Da jedoch auch die Ladung mit der Größe korreliert, erhält man so eine Auftrennung, wobei die kleinsten Fragmente die weiteste, die größten die am wenigsten weite Laufstrecke im Gel zurücklegen. Darstellbar werden die Banden durch Zugabe von Ethidiumbromid, welches sich an die DNA bindet und im UV-Licht fluoresziert. Um die Bandenlängen bestimmen zu können, lässt man parallel zur DNA Molekulargewichtsmarker mitlaufen und kann aus der Position der DNA-Banden zu den Banden der Molekulargewichtsmarker auf die Größe der DNA-Fragmente schließen.

Für unsere Zwecke eignete sich das Minigel-System der Firma Stratagene (Heidelberg), wobei Gele entstehen, die einen Laufweg von bis zu 5 cm bieten, ein Taschenvolumen von bis zu 20 µl aufweisen und bei einer Spannung von 50 oder 100 V gearbeitet werden kann. Für 1%ige Minigele wurden 100 ml Joule-Box-Puffer mit 1 g Agarose unter Rühren aufgekocht, dann auf ca. 70°C abkühlen gelassen und 3 µl Ethidiumbromid zugegeben. Bei 65°C wurden die Gele gegossen abkühlen gelassen, vorsichtig die Kämme gezogen und leicht mit Joule-Box-Puffer überschichtet, um eine Austrocknung zu verhindern. Im Kühlschrank gelagert waren die Gele einige Tage haltbar. Die zu untersuchenden DNA-Gemische wurden mit einem Fünftel des Volumens mit 6x Orange G versetzt, um den Verlauf der Banden ohne UV-Licht verfolgen zu können. Bei 100V wurde solange laufengelassen, bis die Spuren etwa 2/3

des Gels durchlaufen hatten. Auf dem UV-Tisch konnten nun die DNA-Banden sichtbar gemacht werden und fotografisch festgehalten werden.

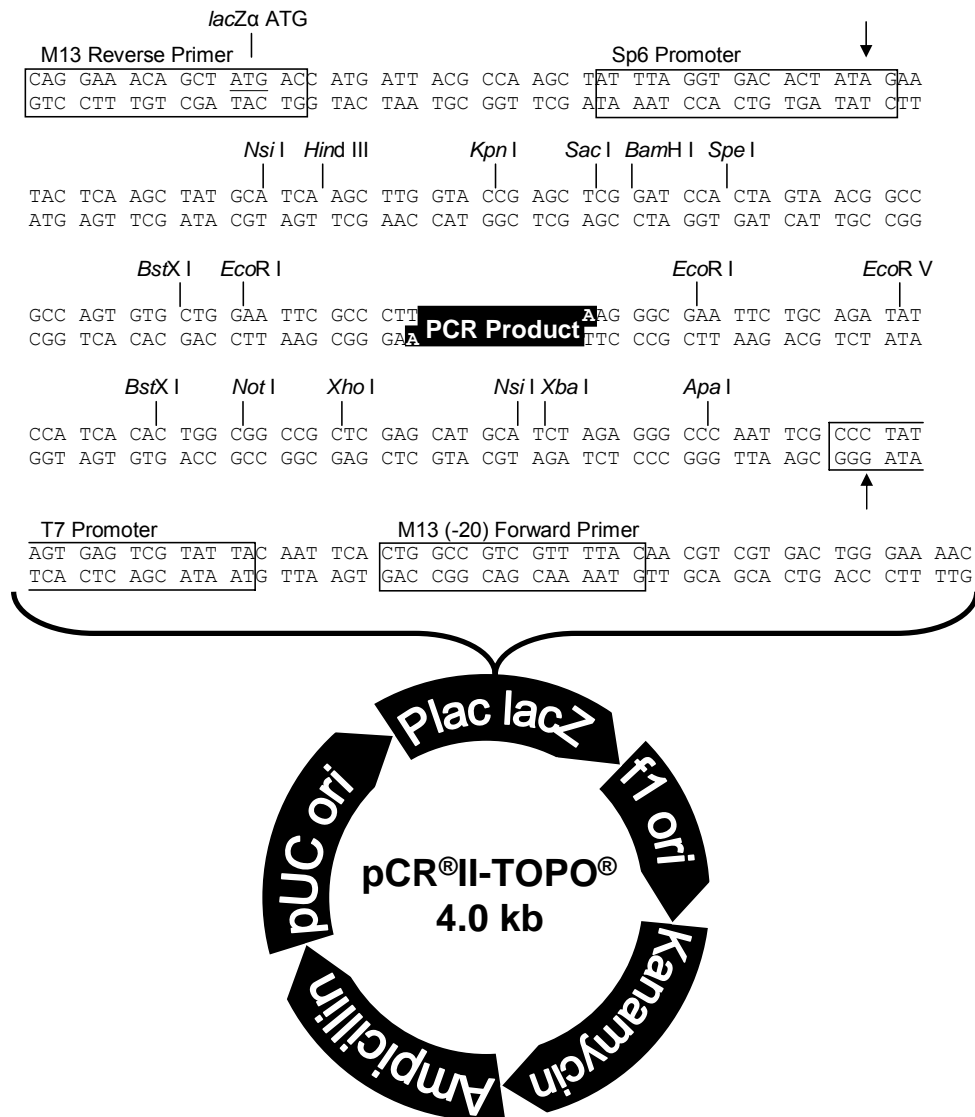
Interessiert man sich für ein bestimmtes DNA-Fragment, ist es möglich, dieses aus dem Gel zu extrahieren. Hierfür haben wir die Bande mit sterilen Einmalskalpellen ausgeschnitten, wobei möglichst wenig DNA-freies Gel mit ausgeschnitten werden sollte, um die Konzentration nicht zu sehr zu senken. Dieses Gelstückchen wurde in ein Extraktions-Tube der Firma Millipore gegeben und bei 7.500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die hierbei gewonnene DNA war direkt für Ligationen, zur Sequenzierung oder Klonierung zu verwenden.

### **3.1.14 Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCRII-TOPO-Vektor**

Für Klonierungen von PCR-Fragmenten in einen Vektor wurde ein System von Invitrogen benutzt, welches den pCRII-TOPO-Vektor verwendet. Dieses Kit benutzt den Überhang einer Purinbase Adenosin, der bei PCRs mit der Taq-Polymerase entsteht, für den Einbau des Fragments in den Vektor (Abb. 5). Durch eine SP6-Promotor-Region 5'-seitig und eine T7-Promotor-Region 3'-seitig vom eingebauten PCR-Fragment, eignet sich der Vektor besonders für die Synthese von RNA-Sonden, wie in 3.2.2 beschrieben. Der Vektor weist ferner diverse mögliche Schnittstellen für viele gebräuchliche Restriktionsendonukleasen, sowie eine Ampicillin-Resistenz auf, die wir für alle Selektionsvorgänge benutzten.

Es wurden 2 µl des mit der DNA-Extraktion aus dem Gel gewonnenen PCR-Fragments, sowie 0,5 µl Salt-Solution, 2 µl ddH<sub>2</sub>O und 0,5 µl des pCRII-TOPO-Vektors zu einer Klonierungsreaktion zusammenpipettiert und bei RT für 5 Minuten inkubiert, danach auf Eis gestellt. Derweil wurde ebenfalls auf Eis ein One Shot<sup>®</sup>E.coli-Aliquot aufgetaut. Nun wurden 2 µl der Klonierungsreaktion in das One Shot<sup>®</sup>E.coli-Aliquot gegeben, gründlich vermischt und auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für die Zellen bei 42°C ohne dabei zu schütteln. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium und Überführung in ein 15ml-Tube wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C schüttelnd inkubiert. Es wurden dann 50 µl der Lösung sowie der Rest der Reaktion auf je einer LB-Amp-X-Gal-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen, woraufhin 6–10 „blütenweiße“ Kolonien gepickt wurden, welche nun mittels Übernachtkultur (3.1.1) zur Anlage einer Glycerinkultur (3.1.2) herangezogen werden konnten. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine kommerzielle Sequenzierung kontrolliert und ermittelt, in welcher Orientierung das Fragment eingebaut wurde.





**Komponenten:**

- Sp6 Promotor: Basenpaare 239-256
- Multiple Cloning Site: Basenpaare 269-383
- T7 Promotor: Basenpaare 406-425
- Ampicillin Resistenz: Basenpaare 2173-3033

**Abb. 5: Vektorkarte des pCR®II-TOPO Vektors mit Multiple Cloning Site.** Man sieht die Promotorregionen für die SP6- und T7-RNA-Polymerase, sowie die Thymidin-Überhänge, die das PCR-Produkt mit Adenosin-Überhängen integrieren. Daneben finden sich die verschiedenen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (Bildquelle Invitrogen).

### 3.1.15 Sequenzvergleiche mittels Computer-Programmen im *world wide web*

Für Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Spezies, die Suche nach bestimmten Sequenzen, die Untersuchung der Exon/Intron-Struktur eines Gens und für nötige Sequenzbearbeitungen bei der Primerbestellung wurden folgende Programme verwendet:

Adresse	Funktion
<a href="http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html">www.firstmarket.com/cutter/cut2.html</a>	Simulation der Funktion von Restriktionsenzymen an DNA-Sequenzen
<a href="http://us.expasy.org/tools/dna.html">http://us.expasy.org/tools/dna.html</a>	Translatiert cDNA in Proteinsequenzen
<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	Vergleich von mehreren Sequenzen auf Übereinstimmungen
<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/">www.bioinformatics.org/sms/</a>	Umschreiben einer DNA-Sequenz in ihre reverse und komplementäre Folge
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>	Suche nach Sequenzfragmenten in Datenbanken genomischer Sequenzen
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi</a>	Sequenzsuche/Pubmed
<a href="http://www.ensembl.org/Danio_rerio/blastview">www.ensembl.org/Danio_rerio/blastview</a>	Suche nach Sequenzfragmenten in Datenbanken genomischer Sequenzen des Zebrafisch
<a href="http://www.thermohybid.de/cgi-bin/oligos-new/order.py">www.thermohybid.de/cgi-bin/oligos-new/order.py</a>	Primer-Kalkulation und gleichzeitige Online-Bestellung
<a href="http://www.calliphora.de/mb_links">www.calliphora.de/mb_links</a>	diverse molekularbiologische Links

## 3.2 *In-situ* Hybridisierung

### 3.2.1 Ziel der Methode

Bei der *in-situ* Hybridisierung handelt es sich um eine Methode, bei der man versucht, die Transkription eines bestimmten Gens zu untersuchen. Es wird eine Sonde, die komplementär zur Messenger-RNA (mRNA) des Gens ist, in einem für die Hybridisierung geeigneten Milieu mit Proben des zu untersuchenden Gewebes, sei es auf Objektträgern oder in Reaktionsgefäßen mit kleinen „*Whole-mount*“-Präparaten, zusammengebracht. Liegt nun in dem Gewebe mRNA des zu untersuchenden Gens vor, wurde das Gen also zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme gerade transkribiert, so kann

die Sonde an die mRNA binden, ein so genanntes Hybrid bilden. Daraufhin wird die überschüssige Sonde, die nicht gebunden hat, abgewaschen und im Weiteren die Orte der Transkription mittels eines Detektionssystems der Hybride bestimmt.

### **3.2.2 Herstellung einer geeigneten Digoxigenin-markierten RNA-Sonde**

Es wurde die E.coli-Kultur mit dem Vektor, in dem die cDNA des Gens enthalten ist, gegen dessen mRNA die Sonde gerichtet sein soll, durch Übernachtskultur (3.1.1) vermehrt, mittels MiniPrep der Vektor aus den Bakterien isoliert (3.1.3) und die zirkuläre Vektor-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten (3.1.6). Hierbei musste beachtet werden, ob die cDNA in 5'-3'-Richtung oder umgekehrt in den Vektor eingebaut wurde. Damit wurde die Promotor-Region bestimmt, von der aus abgelesen die Sonde die richtige Orientierung erhielt. Das Restriktionsenzym wurde daraufhin aus den möglichen Schnittstellen jenseits des Fragments ausgewählt (siehe auch Abb. 5). Für RNA-Polymerisation mit der SP6-Polymerase verwendeten wir NotI, für solche mit der T7-Polymerase HindIII. Die linearisierte Vektor-DNA wurde nun für die RNA-Synthese-Reaktion mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (3.1.8) gereinigt. Nach Fällung der DNA (3.1.7) wurde sie in 20 µl RNase freiem ddH<sub>2</sub>O gelöst. Für die nachfolgende Synthese-Reaktion, bei der die entstehende RNA mit Digoxigenin markiert wurde, verwendeten wir den „Dig RNA Labeling Kit“ der Firma Roche. Dieses Kit verwendet RNA-Polymerasen, die als Startregion einen SP6- oder T7-Promotor benutzen. Als Nukleotide werden den Polymerasen die üblichen vier Nukleotide angeboten, wobei bei den UTPs ein Anteil von 35% mit Digoxigenin markiert ist. Es wurden 1 µg linearisierter Template-DNA mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O auf 13 µl aufgefüllt, 2 µl NTP labeling mixture, 2 µl Transkription buffer, 1 µl RNase inhibitor und 2 µl RNA Polymerase T7 oder SP6, je nach vorher bestimmter Promotorregion, auf Eis pipettiert. Nach kurzem Mischen und kurzem Abzentrifugieren wurde bei 37°C für 2 Stunden inkubiert und anschließend die Ausbeute mittels photometrischer Messung (3.1.9) bestimmt.

### **3.2.3 Dot Blot zur Abschätzung des Färbepotentials der Sonden**

Da die Stärke der Färbung mit diesen Sonden nicht nur proportional zur eingesetzten Sondenmenge ist, sondern auch vom UTP-Gehalt der Sondensequenz abhängt, wurde in einer Verdünnungsreihe der Färbegrad sowohl der Antisense-Sonde bestimmt, die die

Transkription nachweisen soll, als auch der Sense-Sonde, die eine Kontrolle darstellt. Für die Experimente konnte dann ein entsprechender Abgleich der eingesetzten Sondenmenge bei den Experimenten vorgenommen werden und somit ausgeschlossen werden, dass das stärkere Signal bei der Antisense-Sonde nur auf deren höheres Färbepotential der Sonde beruht. Hierfür wurden für die Antisense-Sonde, die Sense-Sonde und eine Kontrolle aus dem „Dig RNA Labeling Kit“ der Firma Roche Verdünnungsreihen pipettiert, wobei mit RNA Delution Buffer verdünnt wurde und Endkonzentrationen von 1 ng/ $\mu$ l, 10 pg/ $\mu$ l, 3 pg/ $\mu$ l und 1 pg/ $\mu$ l entstanden. Hiervon wurde je 1  $\mu$ l auf eine Nylonmembran aufgebracht und durch Crosslinking in der UV-Kammer fixiert. Die Detektion der Spots erfolgte auf dieselbe Weise wie bei den Objektträgern der *in-situ* Hybridisierung, entspricht also dem Ablauf ab dem zweiten Tag (3.2.6).

### 3.2.4 Herstellung von Gefrierschnittpräparaten

Für die *in-situ* Hybridisierungen an Mäusehirnen wählten wir die Verwendung von Gefrierschnittpräparaten. Diese sind einfach herzustellen und die Erhaltung der RNA ist trotzdem sichergestellt. Mit einem nuchalen Skalpellschnitt wurde die Entnahme der Hirne aus den Mäusen begonnen, die gerade erst gestorben sein durften. Vom Foramen magnum ausgehend wurde mit einer scharfen Schere unter langsamen Vorschieben der Spitze die Schädelkalotte in einer sagittalen, von okzipital nach frontal gerichteten Schnittführung gespalten, dann das gesamte Hirn vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und die Hirnnerven durchtrennt. Sodann wurde unter der Medulla oblongata das Rückenmark durchtrennt, das nun freipräparierte Mäusehirn in eisgekühltem 1xPBS gewaschen und durch Überstäuben mit einem Puder aus zerstoßenem Trockeneis gefroren. Diese Art des Einfrierens gewährleistet ein rasches, aber weniger harsches Einfrieren, als das Einfrieren in flüssigem Stickstoff. In Alufolie verpackt erfolgte die Lagerung im -80°C-Schrank. Die so gewonnenen Hirnpräparate wurden an einem Kryotom des Gerätetyps Jung CM 3000 von der Firma Leica (Bensheim/Deutschland) mit einer Schichtdicke von 10  $\mu$ m geschnitten. Hierbei verwendeten wir Temperaturen von -30°C für die Raumluft und den Schneidblock des Kryotoms. Die so entstandenen Schnitte wurden vom Schneidblock auf SuperFrost<sup>®</sup>-Objektträger der Firma Menzel-Glaser übertragen und mit einem warmen Finger unter dem Objektträger glatt gezogen. Sodann wurden die Schnitte sofort wieder bei -80°C eingefroren.

### 3.2.5 Hybridisierung der RNA-Sonde mit der komplementären mRNA

Die Schritte, bis die RNA-Sonde an die mRNA hybridisiert hatte, bestimmten den ersten Tag einer *in-situ* Hybridisierung. Dieser gesamte Tag muss unter strenger RNase-Freiheit erfolgen, d.h. auch alle verwendeten Lösungen mussten nach dem ansetzen autoklaviert und steril filtriert werden. Wenn nicht anders angegeben erfolgten die Inkubationen bei Raumtemperatur. In eisgekühltem, frisch angesetzten 4%PFA wurden die Schnitte in einer Küvette 10 Minuten fixiert. Für dreißig Minuten wurde in 30%iger Saccharose-Lösung entwässert. Hierauf folgten zwei Waschschrte mit 1xPBS in Küvetten auf einem Taumelinkubator für jeweils 5 Minuten. Nach zweimaliger Inkubation mit frisch angesetztem Glycinpuffer für jeweils 5 Minuten, wurden die Schnitte in Triton-X-Puffer für 15 Minuten inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit 1xPBS von je 5 Minuten, wurden die Schnitte mit 2%PFA für 5 Minuten refixiert. Es folgte eine Acetylierung in Postfixationslösung über 10 Minuten. Nun wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer überführt und mit Prähybridisierungslösung überschichtet, mit Parafilm gegen Austrocknung abgedeckt und eine Stunde lang bei 37°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Danach erfolgte über Nacht bei 37°C im Hybridisierungsöfen die eigentliche Hybridisierung, für welche die Schnitte mit Hybridisierungslösung überschichtet und wiederum mit Parafilm abgedeckt wurden. Der Lösung wurden zuvor frische sssSS-DNA für eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml und die RNA-Sonde in einer dem Dot Blot entnommenen Konzentration zugesetzt. Die Sonde und die sssSS-DNA waren vorher in 1 µl Hybridisierungslösung durch Erwärmen auf 95°C für 5 Minuten denaturiert worden.

### 3.2.6 Detektion der Digoxigenin-Markierung

Die folgenden Schritte entsprechen dem zweiten Tag, an dem nun nicht mehr RNase-frei gearbeitet werden muss. Zuerst wurde die überschüssige RNA-Sonde in vielen Waschschrten entfernt, wozu je dreimal 10 Minuten mit 4xSSC und 2xSSC, je 10 Minuten mit 0,1xSSC und 0,05xSSC und 5 Minuten mit TBS auf dem Kippschüttler gewaschen wurde. Die Waschlösungen waren vorher auf 37°C angewärmt worden. Es folgte eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen, damit der Anti-DIG-Ak auch nur an das Digoxigenin der Sonden und nicht unspezifisch bindet. Für diesen Zweck wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Absättigungslösung inkubiert. Die Antikörperbindungsreaktion fand für zwei Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer

statt. Die Schnitte wurden mit Absättigungslösung überschichtet, der Anti-DIG-Ak im Verhältnis 1:5000 zugesetzt war. Es folgten zwei weitere Absättigungsschritte von je 10 Minuten mit Absättigungslösung, dann zehnminütiges Waschen in PBS auf dem Kipptisch, sodann wurden die Schnitte mit Detektionspuffer 5 Minuten lang für die Farbreaktion vorinkubiert und schließlich mit Farblösung überschichtet, die Levamisol zur Inaktivierung unspezifischer Alkalischer Phosphatasen enthielt. Die Farblösung kann mehrmals gewechselt werden, bis sich nach ca. einer Stunde eine deutliche Färbung zeigt und mit Wasser abgestoppt wird. Man kann auch die Verdünnung der Sonde sehr gering wählen (z. B. 3pg/ $\mu$ l, je nach Dot Blot) und über Nacht färben lassen. Nach dem Abstoppen wurden die Schnitte mit einem wasserlöslichen Eindeckmittel und einem Deckgläschen zur Aufbewahrung vorbereitet. Die Farbe ist so für einige Wochen stabil und die Ergebnisse in diesem Intervall dokumentierbar.

### **3.3 Reverse-Transkriptase-PCR**

#### **3.3.1 Ziel der Methode**

Mit der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) kann man qualitativ die Transkription eines bestimmten Gens in einem bestimmten Gewebe nachweisen. Allerdings ist der Grad der Aktivierung dieses Gens quantitativ nur unzureichend möglich, da die PCR nicht streng exponentiell verläuft. Es ist also eine Methode, die orientierend nach Orten im Organismus oder nach Stadien innerhalb der Entwicklung sucht, an oder in denen ein bestimmtes Gen, da es hier aktiviert wird, eine Rolle spielen könnte. Es darf aber auch nicht vergessen werden, dass somit nur ein Transkriptionsnachweis gelingt, ob die mRNA aber auch translatiert und es wirklich zu einer Expression des Proteins kommt ist daraus nicht nachzuweisen, allerdings sehr wahrscheinlich. Ausgehend von dem Isolat an mRNA eines Gewebes wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase, das auch in Retroviren vorkommt, ein Gemisch von verschiedensten cDNAs der zugehörigen mRNAs synthetisiert. Ab diesem Schritt erfolgt eine normale PCR mit den Primern, die für das Gen von Interesse entworfen wurden. Wenn nun die entsprechende mRNA in dem Gewebe vorhanden war, das Gen also transkribiert wurde, so hat die Reverse Transkriptase diese in cDNA umgeschrieben und die zugefügten Primer finden ein Template, von dem ausgehend sie die Gensequenz exponentiell vervielfältigen können. Es zeigt sich also bei der Gelelektrophorese eine Bande auf der Höhe der Länge des von den Primern überspannten mRNA-Abschnitts. Liegen in dem Gen Introns vor,

so ist die Bandenlänge um diese kürzer, als die Länge, die man bei Zugrundelage der genomischen Sequenz errechnet hatte.

### 3.3.2 Durchführung

Für unsere RT-PCR-Experimente haben wir Primer entworfen, die wir aus den im *world wide web* veröffentlichten Sequenzen für das TIP39 von Maus und Zebrafisch abgeleitet hatten. Wichtig ist beim Pipettieren auf strenge RNase-Freiheit zu achten, sowie zügig und auf Eis zu arbeiten. Als Template für die Reaktionen haben wir 250 ng poly-A<sup>+</sup>-RNA (isoliert gemäß 3.1.5) in 10 µl ddH<sub>2</sub>O vorgelegt. Als Kontrollen eignen sich Total-DNA, hier erwartet man ein Fragment, das um eventuelle Introns länger ist, sowie eine Negativkontrolle ohne Template. Es wurden 3 µl Primer-Mix, der aus gleichen Teilen „upper strand“-Primer und „lower strand“-Primer (je 10 nMol) bestand, gegeben und dann 12 µl Mastermix hinzu pipettiert, bestehend aus 5 µl 5xBuffer, 5 µl Q-Solution, 1 µl dNTP-Mix und 1 µl Qiagen OneStep RT-PCR Enzym-Mix. Nach kurzem Abzentrifugieren auf den Boden der 0,2ml-Tubes wurden die Proben in den Thermocycler gestellt. Das Programm sah folgendermaßen aus: Zuerst wurde 30 Minuten auf 50°C erhitzt, eine Temperatur bei der die im Enzym-Mix enthaltene Reverse Transkriptase arbeitet, dann 15 Minuten auf 95°C um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Es folgten die 35 PCR-Reaktionszyklen: 1 Minute denaturieren bei 94°C, 1 Minute Annealing-Reaktion bei 60°C und 2 Minuten Elongation bei 72°C. Nach einem terminalen Elongationsschritt von 10 Minuten bei 72°C wurden die Proben bei 10°C gekühlt und die entsprechenden Ergebnisse durch Auftragung auf ein Mini-Gel sichtbar gemacht.

### 3.3.3 Steigerung der Aussagekraft mittels $\beta$ -Aktin-Kontrolle

Um den Grad der Aktivität eines Gens in einem Gewebe/Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu bestimmen, also einen quantitativen Nachweis der zugehörigen mRNA zu liefern, bedarf es einer semiquantitativen RT-PCR, bei der bestimmt wird, zu welchem Zeitpunkt der Reaktionszyklen die DNA-Vervielfältigung linear verläuft. Unter diesen Bedingungen kann man die Konzentration der mRNA des zu untersuchenden Gens relativ zu der eines Markergens angeben. Es kommt hierfür zum Beispiel das  $\beta$ -Aktin in Frage, da von diesem bekannt ist, dass dessen Expression über die verschiedenen Gewebe und verschiedenen Zeitpunkte sehr konstant ist. Wir

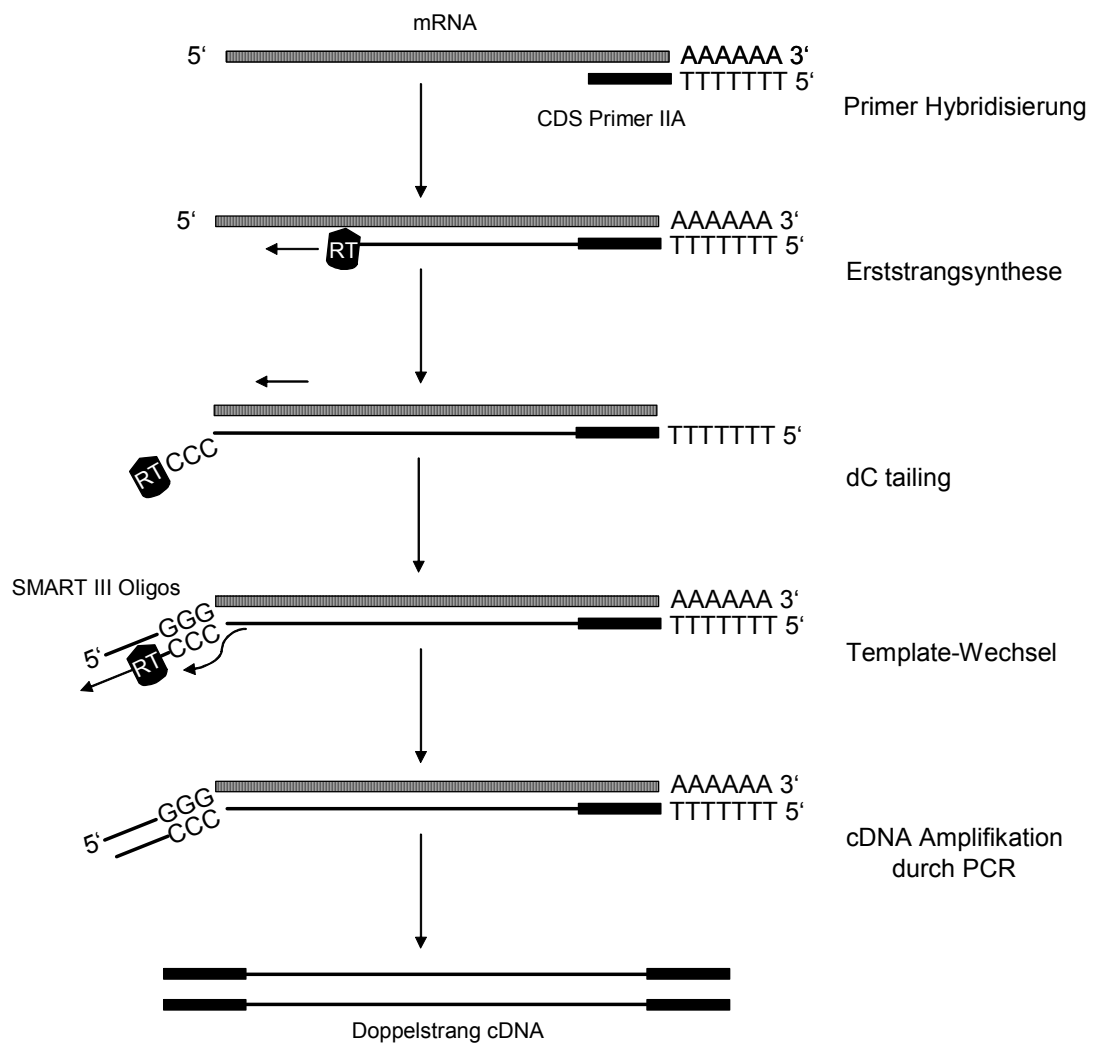
haben lediglich zu unseren Proben eine  $\beta$ -Aktin-Kontrolle mitlaufen gelassen, was uns zwar keine echten quantitativen Ergebnisse lieferte, aber dennoch einen Anhaltspunkt gab, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung des Zebrafisches unser Marker TIP39 stark transkribiert wird. Zur genauen quantitativen Bestimmung würde es einer Real-Time-PCR bedürfen.

### 3.4 RACE-PCR

#### 3.4.1 Hintergrund der Methode

Die RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) wird verwendet, um aus bekannten Fragmenten einer cDNA die Gesamtsequenz dieser cDNA zu finden.<sup>37</sup> Identifiziert man beispielshalber in Datenbanken ein kurzes Stück der gesuchten cDNA eines Organismus, in dem die Sequenz der Gesamt-cDNA noch unbekannt ist, kann man mittels reiner PCR diese nicht klonieren, da kein Primer für die noch unbekanntes 3'- bzw. 5'-Enden designiert werden kann. Zum anderen sind die 5'Enden dieser durch Reverse Transkriptase aus mRNA entstandenen cDNAs oft nicht vollständig abgeschrieben. Wir benutzten den SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit der Firma BD Biosciences Clontech, ein Kit, das besonders geeignet ist, wenn die Ausgangsmenge an poly-A<sup>+</sup>-RNA gering ist<sup>38</sup>. In einer ersten Reaktion, der Erststrangsynthese, wird die mRNA mit einem Reversen Transkriptase vom 3'Ende aus, wo Poly-T-Primer (CDS Primer IIA) am Poly-A<sup>+</sup> Ende hybridisiert. Am 5'Ende der mRNA angelangt synthetisiert diese besondere Reverse Transkriptase noch einige Desoxycytosine an („dC tailing“). Die wiederum von einem Poly-G-Primer (SMART III Oligonukleotide) erkannt werden. Hier kommt es zu einem Template-Wechsel der Reversen Transkriptase und diese repliziert nun zum Ende der Oligonukleotide hin. Eine Einzelstrang cDNA ist somit entstanden, die die vollständige cDNA und eine Sequenz komplementär zu den SMART III Oligonukleotiden enthält. Diese Sequenz und die SMART Sequenz des oligo(dT) Primers dient als universelle „Priming site“ für die folgende PCR Amplifikation (siehe Abb. 6).





**Abb. 6: Prinzip der RACE-PCR mit der SMART-Technologie.** In der ersten Zeile ist die PolyA+-mRNA zu sehen, an dessen PolyA-Schwanz sich die CDS-Primer mit ihrer PolyT-Struktur hybridisieren. Es folgt die Replikation durch die Reverse Transkriptase (RT). Am Ende der mRNA wird ein desoxyCytosin (dC) Schwanz angehängt, an den die SMART III Oligonukleotide hybridisieren. Hier erfolgen der Template-Wechsel der RT und die Replikation der Oligonukleotid-Sequenz. Der Schritt darunter zeigt die anschließende PCR-Reaktion mit einem genspezifischen Primer, wodurch Doppelstrang cDNA entsteht.

### 3.4.2 Durchführung und Optimierung

Zur Erststrang Synthese wurden 0,5 µg Poly A+-RNA, 1 µl CDS Primer II A, 1 µl SMART III Oligonukleotide und ddH<sub>2</sub>O auf 5 µl vermischt und kurz abzentrifugiert. Nach Inkubation bei 72°C für 2 min. wurde die Probe 2 min. auf Eis gestellt und dann 2 µl 5x First-Strand-Buffer, 1 µl DDT, 1 µl dNTP Mix und 1 µl PowerSkript RT

hinzugefügt. Einer kurzen Zentrifugation folgt eine Inkubation bei 42°C für 1 h. Danach kann der Erststrang bei -20°C gelagert werden.

Die anschließende PCR wurde wie folgt durchgeführt: Es wurden 2,0 µl Erststrang-cDNA-Lösung, 80 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 10x cDNA-PCR-Puffer, 2 µl dNTP Mix, 2 µl genspezifische PCR-Primer (10 µM), 2 µl CDS III/3'- PCR-Primer und 2 µl 50x Advantage-cDNA-Polymerase-Mix zusammen pipettiert. Mit folgendem Schema wurde der Thermocycler programmiert:

5 Zyklen	Denaturierung	94°C	5 sec.
	Annealing	72°C	180 sec.
5 Zyklen	Denaturierung	94°C	5 sec.
	Annealing	70°C	10 sec.
	Extension	72°C	180 sec.
25 Zyklen	Denaturierung	94°C	5 sec.
	Annealing	68°C	10 sec.
	Final Extension	72°C	180 sec.

Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und interessante Banden ausgeschnitten, TOPO-kloniert und zum Sequenzieren geschickt.

### 3.5 Genomische Analyse mittels Southern Blot

#### 3.5.1 Ziel und Hintergrund der Methode

Der Southern Blot, so benannt nach seinem Erfinder Ed Southern, ist ein etabliertes Verfahren in der Molekularbiologie, mit Hilfe dessen z.B. wichtige Erkenntnisse über die Exon/Intron-Struktur der Gene gewonnen wurden. Polynukleotid-Sonden, die gegen eine bestimmte Sequenz des zu untersuchenden Gens gerichtet sind, hybridisieren mit der fragmentierten DNA des Zielorganismus, die vorher mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf einer Nylonmembran fixiert wurde („geblottet“). Erkennt die Sonde ihre Sequenz ergibt sich nach der Detektion der Sonde ein Signal an der betreffenden Stelle. Der Southern Blot stellt somit eine Untersuchungsmöglichkeit der DNA eines Organismus bezüglich eines Gens dar. Er beantwortet Fragen nach möglichen Introns oder, ob das Gen in nur einer Kopie im Genom des Organismus vorkommt („single copy gen“) oder in mehreren Kopien vorliegt. Da wir genomische DNA verwendeten, handelte es sich bei uns um einen so genannten genomischen Southern Blot.

### **3.5.2 Vorbereitung der genomischen DNA**

Es wurde die wie in 3.1.4 beschrieben gewonnene genomische DNA mittels eines Restriktionsverdau (3.1.6) in kleine Fragmente geteilt. Hierfür wurden jeweils 50 µg genomischer DNA mit einer entsprechenden Menge Enzym in einem 100µl-Ansatz eingesetzt. Es kamen die Enzyme BamHI, EcoRI und HindIII zum Einsatz, sowie die genomische DNA von drei verschiedenen Fischen, sodass insgesamt 9 Verdau entstanden. Bei 37°C wurde über Nacht verdaut, jedem Ansatz nochmals 1 µl des entsprechenden Enzyms zugesetzt, eine weitere Stunde bei 37°C verdaut und die Reaktion dann durch Erhitzen auf 68°C für 15 Minuten gestoppt. Damit die Enzyme nicht die Hybridisierungsreaktion behindern erfolgte anschließend eine Phenol/Chloroform-Extraktion (3.1.8) und die präzipitierte DNA (3.1.7) wurde in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

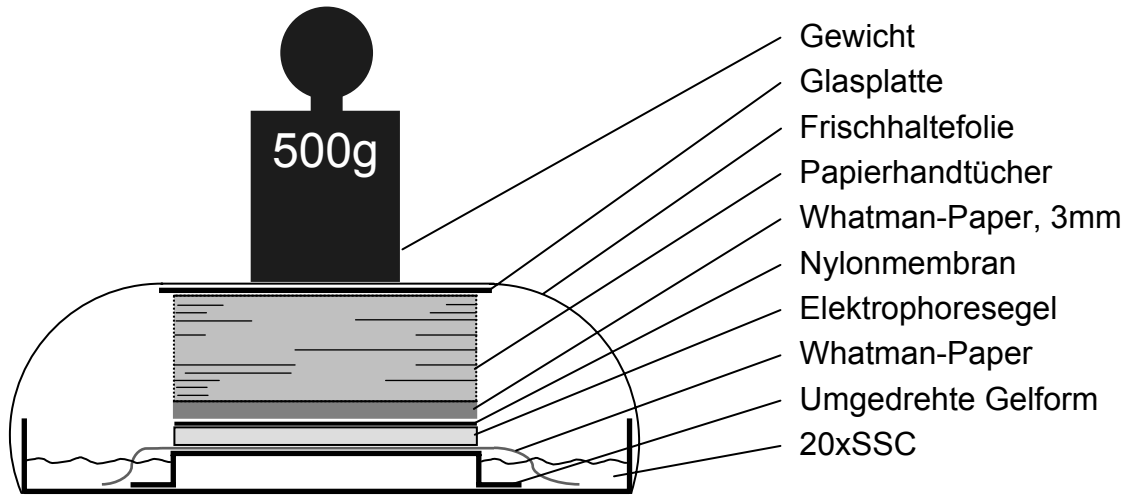
### **3.5.3 Auftrennung mittels Gelelektrophorese**

Die so entstandenen 9 Proben wurden mit einem 11 cm x 14 cm großen, 1%igen Agarosegel mit 60µl-Taschen aufgetrennt. Den Proben war vorher 20% 6xLoading Dye zugesetzt worden. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V über ca. 6 Stunden, wobei der auf 7°C gekühlte Joule-Box-Puffer zweimal getauscht wurde, um die Temperatur im Gel nicht zu sehr ansteigen zu lassen. Nach der Auftrennung wurde das Gel auf dem UV-Tisch photographiert.

### **3.5.4 Blotting der DNA auf eine Nylonmembran**

Zur Vorbereitung des Blotten wurde nun das Agarosegel bei Raumtemperatur für 10 Minuten in Depurinisierungslösung, dann zweimal 20 Minuten in Denaturierungslösung und schließlich zweimal 20 Minuten in Neutralisierungslösung geschwenkt. Dann wurden das Gel, die Whatman-Paper und die vorbereitete Nylonmembran in 20xSSC vorinkubiert und der Blot wie in Abb. 7 dargestellt aufgebaut, mit Frischhaltefolie gegen Verdunstung abgedeckt und über Nacht stengelassen. Die Kapillarkräfte ziehen nun das 20xSSC aus dem Bodengefäß durch das Gel, die Membran, die Whatman-Paper in die Papiertücher. Hierbei wird die DNA aus dem Gel „mitgerissen“ und bleibt in der feinporigen Membran haften. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran kurz in 6xSSC geschwenkt und mittels Kontrolle am UV-Tisch der Erfolg des Blottens überprüft, denn das Gel sollte dann restlos leer sein. In diesem Fall wird die DNA auf

der Nylonmembran durch Crosslinking im UV-Ofen mit 125 mJoule fest fixiert. Kann das Experiment nicht direkt weitergeführt werden, ist die Membran in Alufolie auch bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lagerbar.



**Abb. 7: Aufbau eines Southern Blots.** Zu sehen ist die typische Schichtung des Blots mit dem SSC-Bad am Boden einer Schale. Das SSC wird über das Whatman-Papier durch das Gel über Kapillarkräfte gesogen und reißt dabei DNA aus dem Gel mit, die dann auf der Nylonmembran hängen bleibt.

### 3.5.5 Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter RNA-Sonde

Die folgenden Schritte bis zum Ende der Hybridisierung müssen RNase-frei erfolgen, da eine empfindliche RNA-Sonde zum Einsatz kommt. Es wurde die ULTRA Hyb-Hybridisierungslösung bei  $68^{\circ}\text{C}$  verflüssigt und die Nylonmembran mit der DNA-Seite nach innen zusammengerollt in eine autoklavierte Hybridisierungsflasche gegeben. Dann wurden je  $\text{cm}^2$  Nylonmembran 0,2 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung in die Flasche gegeben und diese bei  $50^{\circ}\text{C}$  in einem Hybridisierungssofen taumelnd für eine Stunde inkubiert. Von der Digoxigenin-markierten RNA-Sonde, die wie in 3.2.2 beschrieben synthetisiert wurde, wurden ca.  $1\ \mu\text{l}$  je 10 ml Hybridisierungslösung direkt in die Flasche pipettiert, wobei die Sonde zur Vermeidung lokaler Präzipitate vorher mit 1 ml Hybridisierungslösung verdünnt werden kann. Bei weiterhin  $50^{\circ}\text{C}$  wurde über Nacht taumelnd im Hybridisierungssofen inkubiert.

### 3.5.6 Immunologische Detektion von Banden

Die Detektion erfolgte mit einem Anti-Dig-AP-Antikörper, der mit der angehängten Alkalischen Phosphatase (AP) eine Farbstoffreaktion erzeugen kann. Zuerst wurde die Nylonmembran zweimal 5 Minuten in  $2\times\text{SSC}/0,1\%\text{SDS}$  und zweimal 15 Minuten in

0,1xSSC/0,1%SDS bei 50°C gewaschen. Danach erfolgte bei Raumtemperatur eine Äquilibrierung mittels Schwenken im Puffer DIG-1, dann eine Inkubation für 30 Minuten in Puffer DIG-2 zur Abblockung von unspezifischen Bindungsstellen. Frischem DIG-2 Puffer wurde 1:5000 der abzentrifugierten Antikörper Anti-Dig-AP zugesetzt und damit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Antikörperbindung erfolgten zwei 15minütige Waschschrte mit DIG-1, um den überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Nach Äquilibrieren in Puffer DIG-3 für zwei Minuten wurde die Membran mit Färbelösung überschichtet und die Farbreaktion im Dunkeln erfolgte über Nacht. Hierbei kann die Färbelösung mehrmals gewechselt werden, falls die Substrate verbraucht sind. Nach Abstoppen der Reaktion durch Schwenken in H<sub>2</sub>O wurde der Blot photographiert.

### **3.6 Genomische Lokalisationsbestimmung mittels Radiation Hybrid Mapping**

#### **3.6.1 Ziel und Hintergrund der Methode**

Beim Radiation Hybrid Mapping handelt es sich um eine neue Methode, mit deren Hilfe eine genaue Kartierung eines Genoms möglich ist. Diese spielte auch bei der Kartierung der Mäuse- und Menschengene eine wichtige Rolle. Es werden eine Zelllinie des Donor-Organismus (Mensch, Zebrafisch, Fliege etc.), dessen Genom durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen einer Stärke von 2.000-9.000 rad an zufälligen Stellen fragmentiert wurde, mit einer Zelllinie eines Akzeptor-Organismus fusioniert. Hierbei entstehen viele Hybride, die dann jeweils einen Teil des Donor-Organismus enthalten und mittels vieler Marker näher klassifiziert werden können. Beim von uns verwendeten LN54-Panel, hergestellt von einer Arbeitsgruppe um Neil Hukriede, wurden AB9-Zellen des Zebrafisches (Donor) mit B78-Melanomzellen der Maus (Akzeptor) fusioniert. Hierbei kamen Strahlungen von 4.000 und 5.000 rad zum Einsatz, wobei darauf geachtet wurde, dass die Rate des eingebauten Fremdgenoms durchschnittlich bei 22% liegt. Das 93 Zelllinien enthaltende Panel wurde mit Markern für Sequenzlängen-Polymorphismen, 84 bekannten Genen und 122 ESTs (expressed sequence tag) näher charakterisiert und kartiert. Es deckt etwa 88% des Zebrafisch-Genoms ab<sup>39</sup>.

#### **3.6.2 Praktische Durchführung**

Um nun von unserem Marker drTIP39 die Position im Zebrafisch-Genom und damit mögliche bekannte Knockout-Fische dieser Region zu finden, haben wir die extrahierte

DNA dieser 93 Zelllinien als Template für eine PCR benützt. Diese DNAs wurden uns freundlich von Christoph Winkler, Physiologische Chemie I, Universität Würzburg überlassen. Zuerst musste getestet werden, ob unsere verwendeten Primer für drTIP39, drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r) bei einer PCR mit der unveränderten genomischen DNA der Mäusezelllinie B78 als Template kein Fragment, bzw. dass diese Primer bei der unveränderten genomischen DNA der Zebrafischzelllinie AB9 als Template genau ein Fragment der von uns erwarteten Länge von 300 Basenpaaren vervielfältigten. Dann konnten PCRs für alle 93 Zelllinien durchgeführt werden, wobei je 100 ng DNA als Template eingesetzt wurden. Ansonsten wurden die PCRs wie in 3.1.12 beschrieben durchgeführt. Nach Auftragung der PCR-Produkte auf einem 2%igem Agarosegel wurden die erhaltenen Banden ausgewertet: Eine starke Bande erhielt eine „1“, eine schwache Bande eine „2“ und keine Bande eine „0“. Das Experiment sollte mindestens zweimal wiederholt werden.

### 3.6.3 Auswertung am Computer

Die so erhaltenen Binärcodes einer Länge von 93 Zahlen wurden im *world wide web* unter <http://mgchd1.nichd.nih.gov:8000/zfrh/beta.cgi> analysiert. Das dort vorhandene Programm vergleicht den eingegebenen Binärcode mit denen der bekannten und kartierten Marker. So wird eine Zuordnung zu einem Marker einer Linkage Group und hierfür ein LOD-Score, der die Übereinstimmung mit dem Marker widerspiegelt, errechnet, sowie der nächstpassende Marker wiederum mit LOD-Score angegeben. Unter [www.zfin.org](http://www.zfin.org) kann nun nach einem bekannten Knockout-Fisch gesucht werden, dessen Knock-out in der Region des benachbarten Markers liegt.

## 3.7 *In-situ* Hybridisierung am *whole-mount* Zebrafisch Embryo

Zum Hintergrund der Methode sei auf Kapitel 3.2.1 verwiesen. Das besondere beim Zebrafisch ist, dass man wegen der geringen Größe und der in den ersten 24h fehlenden Pigmentierung gut *in-situ* Hybridisierungen am *whole-mount* Präparat durchführen kann.

### 3.7.1 Vorbereitung der Zebrafisch Embryonen

Die Embryonen wurden nach Tabellen einem Stadium 16 hpf entsprechend gesammelt. Danach wurde unter einem Binokular-Mikroskop das Chorion mit einer feinen Kanüle

entfernt. Die so erhaltenen Zebrafisch Embryonen wurden in 4% PFA in PBS über Nacht bei 4-8°C fixiert. Danach wurden diese in 100% Methanol überführt, dieses einmal aufgefrischt und die Embryonen in 1,5ml-Tubes bei -24°C eingefroren. So sind diese für mehrere Monate zur weiteren Verwendung konserviert.

### **3.7.2 Herstellung der Hybridisierungs-Sonde für drTIP39**

Hierbei wurde analog der Sonden-Herstellung für das Mäuse-TIP39 vorgegangen (3.2.2). Auch wurde eine Sense-Sonde zur Kontrolle angefertigt. Für die verwendete Sequenz sei auf den Ergebnis-Teil 4.1.8 verwiesen.

### **3.7.3 Durchführung der Hybridisierung**

Es wurde analog zum Protokoll von Hauptmann und Gerster<sup>40</sup> vorgegangen. Zunächst wurden die Embryonen viermal in PBST je 5 Minuten gewaschen, danach erfolgte ein Verdau in Proteinase K 1:1000 für 6 Minuten. Nach kurzem Waschen in PBST wurden die Embryonen für 20 Minuten in 4% PFA in PBS refixiert. Danach erfolgte eine erneute Wäsche mit PBST viermal 5 Minuten. Den Embryonen wurde dann 300 µl Hybridisierungslösung zugegeben und diese für 2 Stunden bei 60°C prähybridisiert. Im nächsten Schritt wurde die Hybridisierungslösung abgezogen und die Embryonen mit 100 µl frischer Hybridisierungslösung, die 100 ng Digoxigenin-markierte RNA-Sonde enthielt, bedeckt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 60°C durchgeführt.

### **3.7.4 Detektion der Hybride**

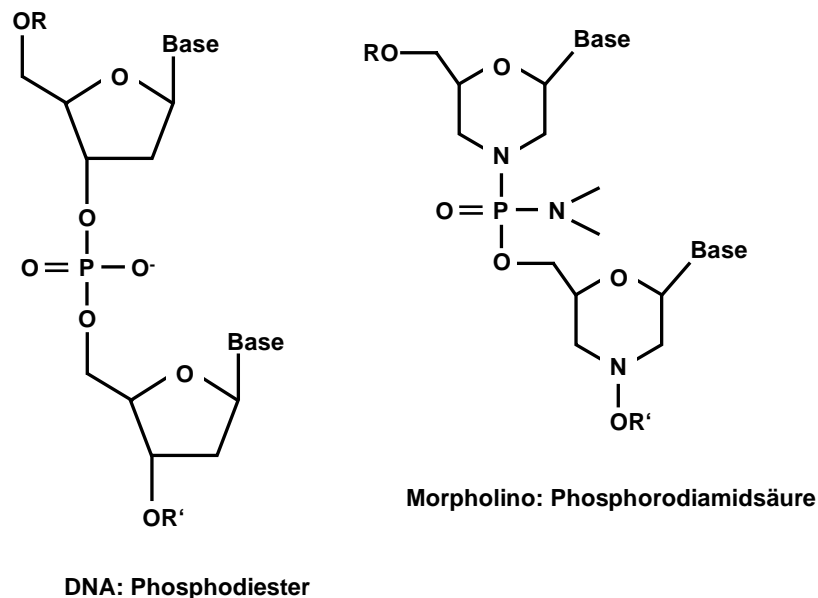
Am folgenden Tag wurden die Embryonen mit frischer Hybridisierungslösung übergossen. Danach wurden sie schrittweise bei 60°C in 2xSSC überführt, wobei jeweils 15 Minuten 3:1, 1:1 und 1:3 (Hybridisierungslösung : 2xSSC) verwendet wurde. Daraufhin wurden die Embryonen zweimal mit 2xSSC übergossen, ehe für je 30 Minuten bei 60°C mit 0,2xSSC/0,1% Triton X-100, dann sechsmal je 5 Minuten in PBST gewaschen wurde. Es folgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation in 1% Absättigungslösung in PBST für 2 Stunden. Daraufhin wurde der Absättigungslösung Anti-Dig-AP in einem Verhältnis von 1:6000 zugegeben und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Die Embryonen wurden mehrfach für 5 Minuten in PBST gewaschen und in PBST bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Morgen wurde erneut mehrfach mit PBST und dann mit AP-Staining Puffer

zweimal 20 Minuten gewaschen. Dann wurden diese in eine 24-well-Microtiterplatte überführt. 500 µl BM Purple und 1 ml AP-Staining Puffer wurden in jedes Well pipetiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Unter dem Binokular-Mikroskop wurde die Signalintensität beobachtet und die Reaktion bei ausreichendem Signal mit PBST gestoppt. Dann erfolgten mehrere Waschschrte mit PBST ehe die Embryonen in 4%PFA/PBS über Nacht bei 4°C fixiert wurden. Nach erneut mehreren Waschschrten mit PBST wurden die Embryonen in 80% Glycerol in PBS bei 4°C aufbewahrt.

### 3.8 Knockown Experimente mit der Morpholino-Technik beim Zebrafisch

#### 3.8.1 Ziel und Hintergrund der Methode

Unter den so genannten „Morpholinos“ werden Oligonukleotide verstanden, die entsprechend der DNA Basen enthalten, aber keine Phosphodiester, sondern Phosphorodiamidsäuren zur Verbindung der einzelnen Nukleotide besitzen (Abb. 8). Diese Morpholinos werden eingesetzt, um mRNA zu hybridisieren. Doppelsträngige RNA wiederum wird im menschlichen Körper, da am ehesten viralen Ursprungs, enzymatisch abgebaut. Somit kann durch Injektion von Morpholinos eine spezifische mRNA herunterreguliert werden, man spricht auch von einem „Knock-down“.



**Abb. 8: Vergleich der Struktur eines Morpholinos mit DNA.** Man sieht die Fünfring-Struktur der Desoxyribonukleotide und die Verbindung mittels einer Phosphodiester-Bindung der DNA. Dagegen ist die Grund-Struktur eines Morpholinos durch Sechsringe gekennzeichnet, die mittels Phosphoramid-Bindung verknüpft sind.



### **3.8.2 Durchführung der Morpholino-Injektionen**

Im Zwei-Zell-Stadium der Entwicklung der Zebrafisch-Eier (ca. 0,5 hpf) wurde ca. 1  $\mu$ l von TIP39 spezifischem Morpholino einer Konzentration von 1,25, 2,5 bzw. 5,0 ng/ $\mu$ l in den Dottersack der Zebrafisch-Eier, in die direkte Nähe der beiden Zellen injiziert. Hierfür wurde vorher eine im Vertical Pipette Puller ausgezogene Glaskapillare mit Morpholino befüllt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe des Microinjector 5242 (Eppendorf) unter einem Binokular-Mikroskop (Zeiss). Parallel dazu wird eine gleiche Menge eines Kontroll-Morpholinos in weitere Zebrafisch-Eier injiziert, um toxisch-unspezifische Effekte zu erkennen.

### **3.8.3 Auswertung des Knock-downs**

Im Folgenden wurden dann die Entwicklung der Zebrafisch Embryonen beobachtet, das Überleben nach 24 h ermittelt und phänotypische Veränderungen beobachtet. Durch die Injektion unterschiedlicher Morpholino-Konzentrationen konnte eine Dosis ermittelt werden, bei der das Überleben nach 22 h dem der Embryonen entsprach, die mit einem Kontroll-Morpholino behandelt wurden, und danach der Anteil der phänotypisch veränderten Embryonen, die mit TIP39-spezifischem Morpholino behandelt wurden, bestimmt werden. Nach 22 h wurden die Embryonen in 4% PFA fixiert und photographiert. Statistisch wurden die Experimente dem Chi-Quadrat Test nach Pearson zur Unabhängigkeitstestung, einer Testung auf Varianzgleichheit nach dem Levene Test und dem Student-T-Test zum Mittelwertvergleich zweier unabhängiger Stichproben unterzogen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Studien zum TIP39 des Zebrafisches**

Da die physiologische Bedeutung von TIP39 wie in 1.3 gezeigt noch bei weitem nicht als geklärt angesehen werden kann und bisher lediglich die Gewebsverteilung von TIP39 etwas genauer untersucht wurde, erschien es wichtig, ein einfaches Tiermodell für weitergehende funktionelle Experimente zur Verfügung zu haben. Aus diesem Grund wurde das TIP39 Gen des Zebrafisches untersucht, da dieser ein bei der Hirnentwicklung beliebtes entwicklungsbiologisches Modell darstellt.

#### **4.1.1 Blast-Suche nach dem TIP39 des Zebrafisches**

Mit einer Nukleotid-Sequenz aus der in Mensch und Maus hochkonservierten Region des humanen Prepro-TIP39, nämlich aus der Region des eigentlichen TIP39, wurde eine sogenannte Blast-Suche (vergleiche 3.1.15) in Zebrafisch cDNA Datenbanken durchgeführt. Es fand sich ein Treffer, der eine Sequenzhomologie von 31% zum humanen TIP39 Preprohormon aufwies. Die neu gefundene Sequenz der Zebrafisch TIP39 cDNA und die mittels Online Translation (3.1.15) ermittelte Aminosäure Sequenz (siehe Abb. 9) wurde unter der Accession No. AF486190 in der GenBank veröffentlicht. Bei der Aminosäuresequenz fand sich an Position 25/26 und 118/119 jeweils eine potentielle Schnittstelle.

```

GACAACCTGAGAAGTTGGTGGAGCAATACGTAGAAAGAGGGCACCGTAGGC
AACTTTTTGACAATTAAATACCATCCTAGAGTGTTAGAGAGAACTCTGG
ACAACCGTTAATCTCATTGCATGGACGATTTGCGAATTAGCTTGGAGTAA
AACGTGAGTGATTGGATTTTTGAGTCCACACACTGGAAACAAAGAGCTTC
ATCCACGCAACACACAGTCAAGAGGAAGAACTACTCTGCTAAGATGGCTT 1
TGTCCTTGCCTCCTCGTCCTGCCCTGTTGTTCTTAGTCCTCATGAGTGTG
ACCCTCATGGCATCGGCATTTCCCCAGCCTCAGCTTCGACCTCTGCAAAG
TAACTTGCCTGCAATTGGTCAAGAAGACTCCAAAGGTGAGCAGTGGGAGG 3
TGGTGTATCCATCCATCTCGCTCCGTGATTGGAGCATTGAGATGCTGACC
GCCCCTGATTTTGGTGCAGCTAAGACTGGGAGGGAGCAGCTGGTGGCAGA
TGATTGGCTCCCGCTCAGCCAATCACAGATGGAGGAGGAGCTGGTGAAGG
GCTGGACGGGCGACTGGCCTTCACGGGTGGGTCACCAGCAGAAGAGAAAC
ATAGTGGTGGCAGATGACGCTGCGTTTAGAGAGAAGAGTAAGCTGTTGAC 4
AGCAATGGAGAGACAAAAATGGCTCAACTCCTATATGCAGAAGCTCTTAG 2
TAGTTAATTCAAAGTAATTGTAATCTTTATGTAATTGTATAAATATATAT
AAAGTATGTATAGGGAAAAATGCATTTTGTGTGGGAGAAAAACAAGAATT
TACTCATTACTTCATGAGTAAACAATTAAGGGGTAGGTCAACTGAGAAT
TAAAATTCTGTCATTGAATTCTAAAAA
```

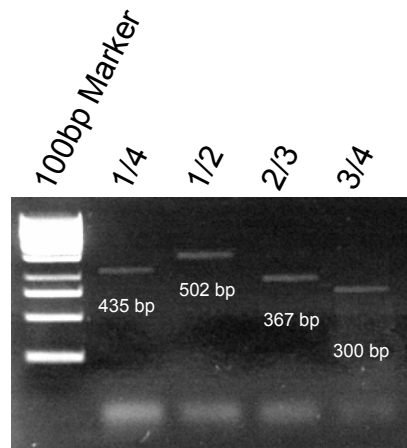
```

MALSLPPRPALLFLVLM SVTLMASA▼FPQPQLRPLQSNLPAIGQEDSKGE
QWEVVYPSISLRDWSIQMLTAPDFGAAKTGREQLVADDWLPLSQSQMEEE
LVKGWTDWPSRVGHQQR▼NIVVADDAAFREKSKLLTAMERQKWLNSYM
QKLLVVNSK
```

**Abb. 9: cDNA und Aminosäure Sequenz des PreproTIP39 des Zebrafisches.** Gezeigt ist die Nukleotid-Sequenz wie sie in der Blast-Suche gefunden wurde. In Fettschrift sind das Start (ATG)- und das Stop (TAA)-Codon gekennzeichnet. Die Nummern 1-4 stehen für die unterstrichenen Primer drTIP39\_1(f), drTIP39\_2(r), drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r). In der unteren Hälfte ist die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz mit den vorhergesagten Schnittstellen als Dreiecke zu sehen. Grau hinterlegt ist die Sequenz, die das Morpholino erkennt (vgl. 4.1.9).

#### 4.1.2 Bestätigung der Sequenz mittels PCR

Zur Bestätigung der elektronisch ermittelten Sequenz des Zebrafisch TIP39 wurde eine PCR durchgeführt. Hierbei wurden aus den in Abb. 9 erkennbaren zwei 5'Primern und zwei 3'Primern die 4 möglichen Primer Paare 1/4, 1/2, 2/3 und 3/4 gebildet. Als Template wurden 0,5 µg Zebrafisch cDNA verwendet, ansonsten die PCR wie in 3.1.12 beschrieben durchgeführt. Es wurden 35 Zyklen mit je 60 Sekunden Denaturierung, 60 Sekunden Annealing und 120 Sekunden Elongation durchgeführt, gefolgt von einem 10-minütigem Elongationsschritt bei 72°C.



**Abb. 10: PCR Zebrafisch TIP39.** Man sieht die vier Bestätigungs-PCRs mit den vier möglichen Primerpaaren und den vorhergesagten Fragmentlängen.

Das durch das Primerpaar 1/2 entstandene PCR Fragment von 502 bp Länge wurde ausgeschnitten und wie in 3.1.14 beschrieben in den pCRII-TOPO Vektor ligiert. Nach Ligation in den Vektor erfolgte eine Kontrolle des Inserts durch Sequenzierung bei der Firma Medigenomix, Martinsried. Das Sequenzierungsergebnis wurde nun nochmals mit den Ergebnissen aus der Blast-Suche verglichen und somit die vorhergesagte Sequenz der Zebrafisch TIP39 cDNA bestätigt.

#### 4.1.3 RACE-PCR für die Zebrafisch TIP39 cDNA

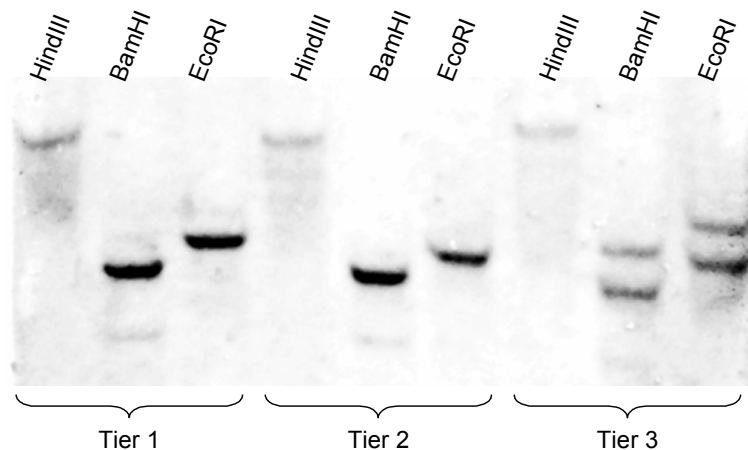
Da es nicht als sicher gelten kann, ob die durch Blast-Suche und Bestätigungs-PCR ermittelte cDNA auch der vollen Länge entspricht, versucht man durch eine RACE-PCR am 3'- und 5'-Ende die Sequenz um einige vielleicht noch vorhandene Nukleotide zu verlängern. Wir verwendeten hierbei den SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit der Firma Stratagene (Heidelberg) und das in 3.4.2 beschriebene Protokoll. Wir benutzten die Primer dr\_TIP39\_5'RACE1 und dr\_TIP39\_5'RACE2 für die 5'RACE-PCR und den Primer dr\_TIP39\_3'RACE1 für eine 3'RACE-PCR. Hierbei wurde bei der 5'RACE-PCR mit dem Primer dr\_TIP39\_5'RACE1 ein Fragment gefunden mit der Sequenz

```
5' ACTTGCCCTGCAATTGGTCAAGAAGACTCCAAAGGTGAGCAGTGGGAGGTGGTG
TATCCATCCATCTCGCTCCGTGATTGGAGCATTGAGATGCTGACCGCCCCTGATT
TTGGTGCAGCTAAGACTGGGAGGGAGCAGCTGGTGGCAGATGATTGGCTCCCGCT
CAGCCAATCACAGATGGAGGAGGAGCTGGTGAAGGGCTGGACGGGCGACTGGCCT
TCACGGGTGGGTCAACCAGCAGAAGAGAAACATAGTGGTGGCAGATGACGCTGCGT
TTAGAGAGAAGAGTAAGCTGTTGACAGCAATGGAGAGAC 3' ,
```

was zwar die bekannte Sequenz bestätigte, aber keine relevante Verlängerung zum 5'Ende hin bedeutete.

#### 4.1.4 Genomischer Southern Blot für das Zebrafisch TIP39

Der Southern Blot für das Zebrafisch TIP39 wurde wie in 3.5 beschrieben durchgeführt. Es wurde die genomische DNA von drei Zebrafischen mit den drei Restriktionsendonukleasen HindIII, BamHI und EcoRI verdaut, die in der bekannten cDNA Sequenz von TIP39 keine Schnittstelle besitzen. Als Sonde wurde eine gemäß 3.2.2 hergestellte DIG-markierte RNA verwendet, als Template für die RNA-Polymerase diente dabei der linearisierte pCRII-Vektor, der das mittels PCR gewonnene 502 bp lange Fragment der Zebrafisch TIP39 cDNA (4.1.2)enthält. Das Ergebnis des Blots ist in Abb. 11 zu sehen.

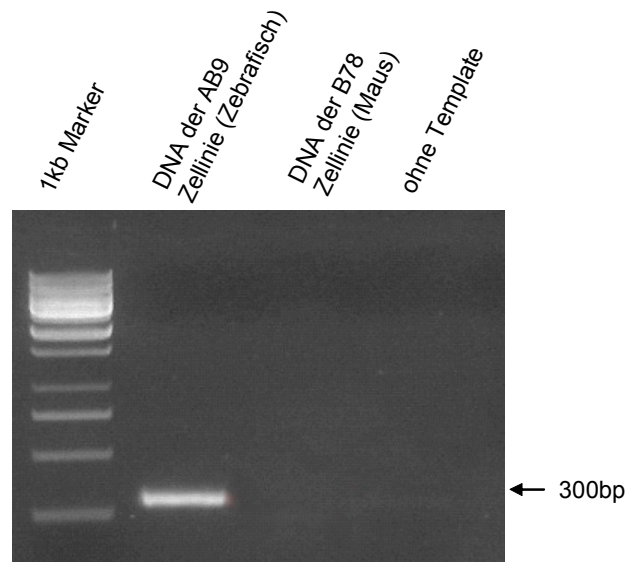


**Abb. 11: Genomischer Southern Blot für das Zebrafisch TIP39.** Die Restriktionsfragmente von den Tieren 1 und 2 stellen sich völlig identisch dar, auch die Bande für HindIII ist zwischen allen Tieren gleich, für BamHI und EcoRI zeigt Tier 3 je eine weitere Bande.

Im Bezug auf HindIII stimmte bei allen 3 Tieren das Restriktionsmuster überein und es zeigte sich jeweils nur eine Bande. Für Tier 1 und Tier 2 galt dies auch bei den Enzymen BamHI und EcoRI, bei denen sich in Tier 3 ein Muster ergab, das sich von dem der Tiere 1 und 2 durch jeweils eine zweite Bande unterschied.

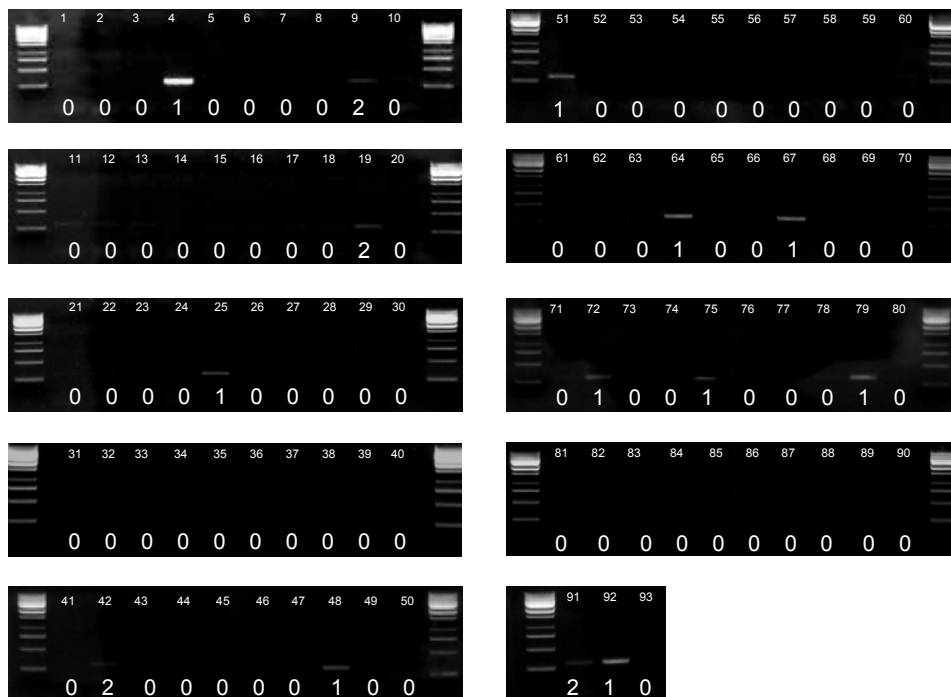
#### 4.1.5 Radiation Hybrid Mapping des Zebrafisch TIP39

Als Vorexperiment wurde eine PCR mit dem Primerpaar drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r) durchgeführt (3.1.12), wobei 0,1 µg DNA der Zebrafisch AB9-Zellen und DNA der Maus Melanomzellreihe B78 als Template eingesetzt wurden, sowie eine Probe ohne Template mitlaufen gelassen wurde, um eine Selbstvervielfachung von Primern auszuschließen. Es wurden 40 Zyklen mit je 60 Sekunden Denaturierung, 60 Sekunden Annealing und 120 Sekunden Elongation durchgeführt, gefolgt von einem 10-minütigem Elongationsschritt bei 72°C. Hierbei zeigte sich in der Probe der AB9-DNA eine Bande der erwarteten Länge von 300 bp, in der Maus Probe hingegen kein Signal, ebenso keines in der Probe ohne Template (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: Kontroll-PCR vor Radiation Hybrid Mapping.** Man sieht in der ersten Spur ein 300 bp langes Fragment, das durch das Primer-Paar drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r) definiert ist, also das Vorhandensein der TIP39 Sequenz in der AB9 Zelllinie. Aus der B78 Zelllinie hingegen lässt sich das Fragment nicht vermehren, auch ergibt sich keine Bande durch eine etwaige Primer-Selbstvermehrung, wie in Spur 3 zu sehen.

Somit war das eigentliche Experiment durchführbar. Die 93 PCR Ansätze wurden nach dem gleichen Temperatur Schema, mit der gleichen Template Menge und den gleichen Primern durchgeführt. Hierbei zeigten sich folgende Banden (Abb. 13), denen die Ziffern 0, 1 oder 2 als Score zugeteilt wurden.



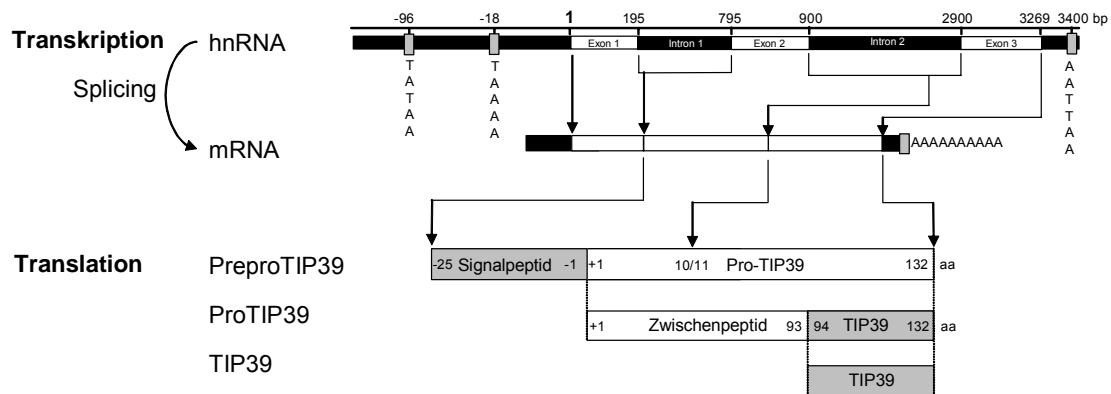
**Abb. 13: Radiation Hybrid Mapping PCR für Zebrafisch TIP39 mit Score.** Zu sehen sind die 93 PCR-Reaktionen mit den jeweiligen Zuordnungen der Ziffern 0, 1 oder 2. Die vervielfältigten Fragmente sind 300 bp lang, das verwendete Primer-Paar ist drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r).

Die Online Auswertung ergab, dass der bestmögliche Marker Z21435 zu unserer TIP39 Sequenz mit einem LOD-Score von 15.3 assoziiert ist, der zweitbeste lediglich mit einem LOD-Score von 10.4. Z21435 liegt in Linkage group 17. Aktuell konnte für diese Region leider keine Zebrafisch-Mutante identifiziert werden, das Wissen über die Lokalisierung ist trotzdem insofern wichtig, als immer mehr Mutanten entwickelt werden und somit auch eine etwaige „TIP39-Mutante“ in Zukunft erkannt werden kann.

#### 4.1.6 Studien zur genomischen Sequenz des Zebrafisch TIP39

Mittels einer Blast-Suche (3.1.15) im Bereich der Linkage group 17 in Datenbanken mit genomischen Sequenzen des Zebrafischs wurde ein mehrere Kilobasen langes Fragment gefunden. Durch Vergleich mit der bekannten cDNA konnte nun die Exon/Intron Struktur des ZebrafischsTIP39 Gens genauer untersucht werden. 96 bp vor dem Beginn der Transkription fand sich eine typische TATAA-Box, eine weitere AT-reiche Stelle findet sich an Position -18 (TAAAA). Es folgt ein erstes Exon von 195 bp Länge, gefolgt vom 600 bp langen ersten Intron. Auf dieses folgt das kurze zweite Exon, das

mit dem Start-Methionin beginnt. Es enthält das 25 bp lange Signalpeptid und den Beginn des Zwischenpeptids. Nach dem 2000 bp langen Intron 2 folgt schließlich das Exon 3, das für den Rest des Zwischenpeptids und das eigentliche TIP39 kodiert. Nach insgesamt 132 Aminosäuren findet sich das Stop-Codon (TAA), ehe sich 131 bp dahinter die Polyadenylierungssequenz anschließt. Dieses für das Zebrafisch TIP39 kodierende Gen ist in Abb. 15 dargestellt. Die Prozessierung des Gens mit Transkription, Splicing, Translation und Schneiden in Signal-, Zwischenpeptid und TIP39 zeigt Abb. 14.



**Abb. 14: Genexpression des Zebrafisch TIP39.** Zu sehen ist im oberen Abschnitt die primär abgeschriebene RNA mit einer TATAA Box 96 bp vor Beginn der Translation sowie die beiden Introns 1 und 2 in schwarzen Boxen. Darunter ist die mRNA nach dem Splicen zu sehen. Wiederum darunter findet sich die Prozessierung der abgeschrieben Aminosäuren vom Prohormon, über Abspaltung der Signal- und Zwischenpeptide zum eigentlichen TIP39.



## Ergebnisse

---

```
ACAAGAAAAATGACACATGTCTTTTTATCTTTTCTGTTTCCCCCTACAAC 50
TTCCGACACAAAGAGAGGTATATTATAATCCCACACAAGCAAATCCTGTAT 100
ATATTCACACTGGCACCTGACAACCTGAGGAAGTTGGTGAAGCAATACCG 150
TAAAAAGAGGCCCGTAGGCAACTTTTTGACAATTANATACCATCCTAGA 200
GTGGTAGAGAGAAACTCTGGACAACCATTAATCTCATTGCATGGACGATT 250
TACGAATTAGCTTGGAGTAAAACGTGAGTGATTGGATTTTTGAGTCCACA 300
CACTGGAAACAAAGAGCTTCATCCACGCAACACACAGTCAAGAGGAAGAA 350
CTACTCTGCTAAGGTAACACATATTTAAATACCACGTTACAAATTAAATC 400
```

### Intron 1 - 600bp

```
ATGGCTTTGTCCTTGCCTCCTCGTCCTGCCCTGTTGTTCTTAGTCCTCAT 1050
  M  A  L  S  L  P  P  R  P  A  L  L  F  L  V  L  M  17
GAGTGTGACCCTCATGGCATCGGCATTTCCCCAGCCTCAGCTTCGACCTC 1100
  S  V  T  L  M  A  S  A  ▼  F  P  Q  P  Q  L  R  P  33
TGCAAAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 1150
L  Q  35
NNNNNTATTATTCCAATTATGATTATTATATTTTTGTTGTTCTTTGTATT 1200
```

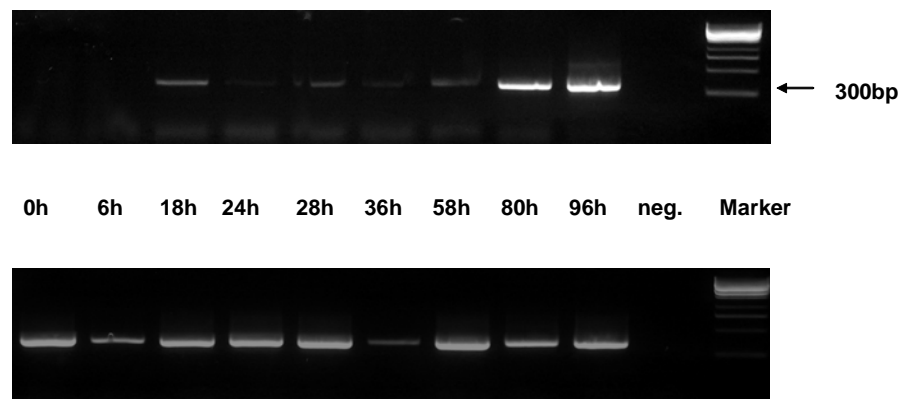
### Intron 2 - 2000bp

```
ACTGGAGACATTTCTAACACTTCTCTCACCTCTAAACAGTAACTTGCCTG 3250
                                     S  N  L  P  39
CAATTGGTCAAGAAGACTCCAAAGGTGAGCAGTGGGAGGTGGTGTATCCA 3300
A  I  G  Q  E  D  S  K  G  E  Q  W  E  V  V  Y  P  56
TCCATCTCGCTCCGTGATTGGAGCATTAGATGCTGACCGCCCCTGATTT 3350
S  I  S  L  R  D  W  S  I  Q  M  L  T  A  P  D  F  73
TGGTGCAGCTAAGACTGGGAGGGAGCAGCTGGTGGCAGATGATTGGCTCC 3400
  G  A  A  K  T  G  R  E  Q  L  V  A  D  D  W  L  89
CGCTCAGCCAATCACAGATGGAGGAGGAGCTGGTGAAGGGCTGGACGGGC 3450
P  L  S  Q  S  Q  M  E  E  E  L  V  K  G  W  T  G  106
GACTGGCCTTCACGGGTGGGTCCACCAGCAGAAGAGAAACATAGTGGTGGC 3500
D  W  P  S  R  V  G  H  Q  Q  K  R  ▼  N  I  V  V  A  123
AGATGACGCTGCGTTTAGAGAGAAGAGTAAGCTGTTGACAGCAATGGAGA 3550
  D  D  A  A  F  R  E  K  S  K  L  L  T  A  M  E  139
GACAAAAATGGCTCAACTCCTATATGCAGAAGCTCTTAGTAGTTAATTCA 3600
R  Q  K  W  L  N  S  Y  M  Q  K  L  L  V  V  N  S  156
AAGTAATTGTAATCTTTATGTAATTGTATAAATATATATAAAGTATGTAT 3650
  K  STOP  157
AGGGAAAAATGCATTTTGTGTGGGAGAAAAACAAGAATTTACTCATTACT 3700
ATTAAAATTCTGTCATTGAATTCTAATTTCAGTTTGTATGACCTTTCTTG 3750
CATGGAAAATTGAAATATTTAGTTAGTAATATGGATTTTGAATGACATGG 3800
CACTAAGATACAT 3850
```

Abb. 15: Das für das Zebrafisch TIP39 kodierende Gen.

#### 4.1.7 Verlauf der Expression von TIP39 während der Zebrafiscentwicklung

Mittels RT-PCR konnte ein semiquantitativer Nachweis von TIP39 während der verschiedenen Entwicklungsstufen von der Befruchtung bis zum Schlüpfen gelingen. Hierzu wurde aus jeweils ca. 100 Eiern einer Entwicklungsstufe eine RNA-Extraktion wie in 3.1.5 beschrieben durchgeführt. Für die Stadien 6, 18, 24, 28, 36, 58, 80 hpf wurde jeweils eine RT-PCR durchgeführt wie in 3.3 beschrieben unter Verwendung der Primer drTIP39\_3(f) und drTIP39\_4(r). Zum Vergleich der RNA Ausbeute wurde jeweils zu den selben Entwicklungsstufen eine RT-PCR für  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Es zeigt sich eine Nachweisbarkeit von TIP39 bereits nach 18hpf.

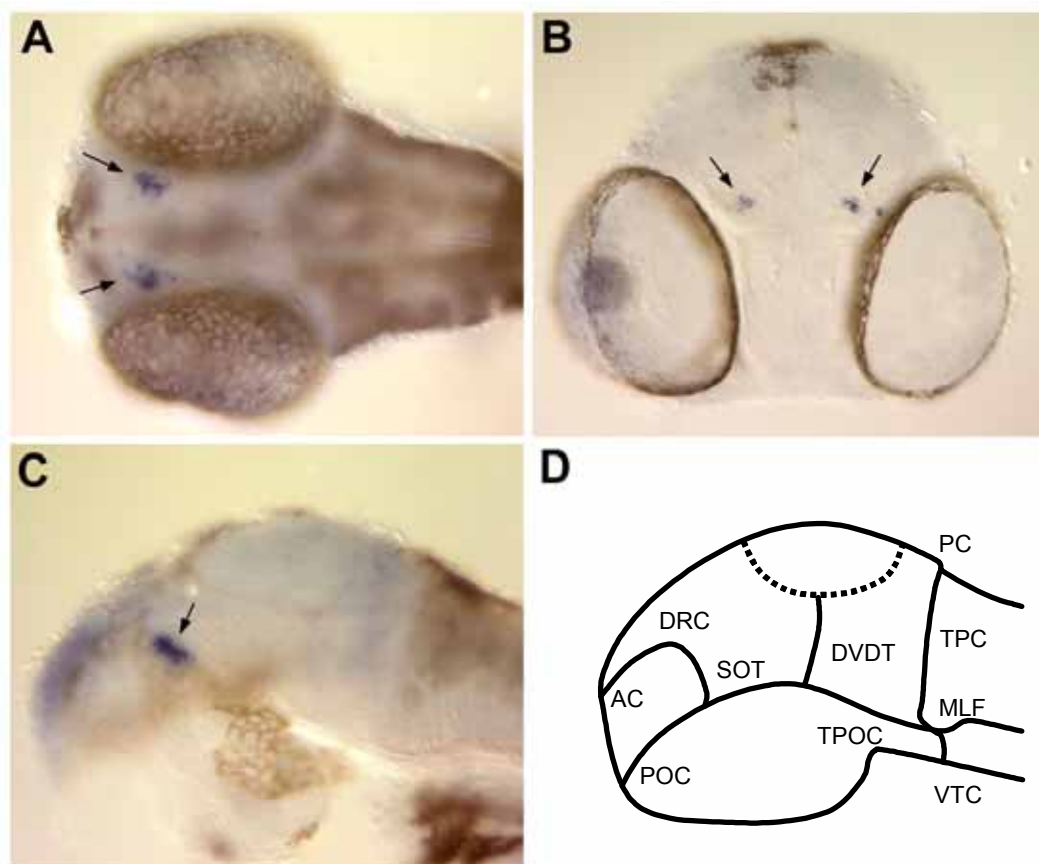


**Abb. 16: Expressionsnachweis von drTIP39 zu verschiedenen Entwicklungsstufen.**

Zu sehen sind Gelelektrophoresen von RT-PCR Produkten. Im oberen Gel ist der Expressionsnachweis von TIP39 auf mRNA Ebene gezeigt, im unteren Gel ist zum Vergleich der Nachweis von  $\beta$ -Aktin zu den gleichen Zeitpunkten der Entwicklung in Stunden nach der Fertilisation. Man sieht also, dass bereits nach 18h eine Expression von TIP39 nachweisbar ist.

#### 4.1.8 Expressionsnachweis von drTIP39 mittels *in-situ* Hybridisierung

Zunächst wurde eine geeignete Sonde für drTIP39 hergestellt. Hierfür wurde das aus der PCR mit den Primern drTIP39\_1(f) und drTIP39\_2(r) entstandene Fragment (4.1.2) in den TOPO-Vektor analog zu 3.1.14 kloniert. Nach Sequenzierung (Medigenomix, Martinsried) konnte die Orientierung des Fragments im Vektor bestimmt werden und eine Antisense-Sonde analog zu 3.2.2 hergestellt werden. Die *in-situ* Hybridisierung an *wohle-mount* Präparaten von Zebrafischen 16 hpf wurde wie in 3.7 beschrieben durchgeführt. Es konnten starke, symmetrische Signale in einem sehr umschriebenen Areal des Zebrafisch-Mittelhirns, nahe des supraoptischen Traktes (Abb. 17) detektiert werden.

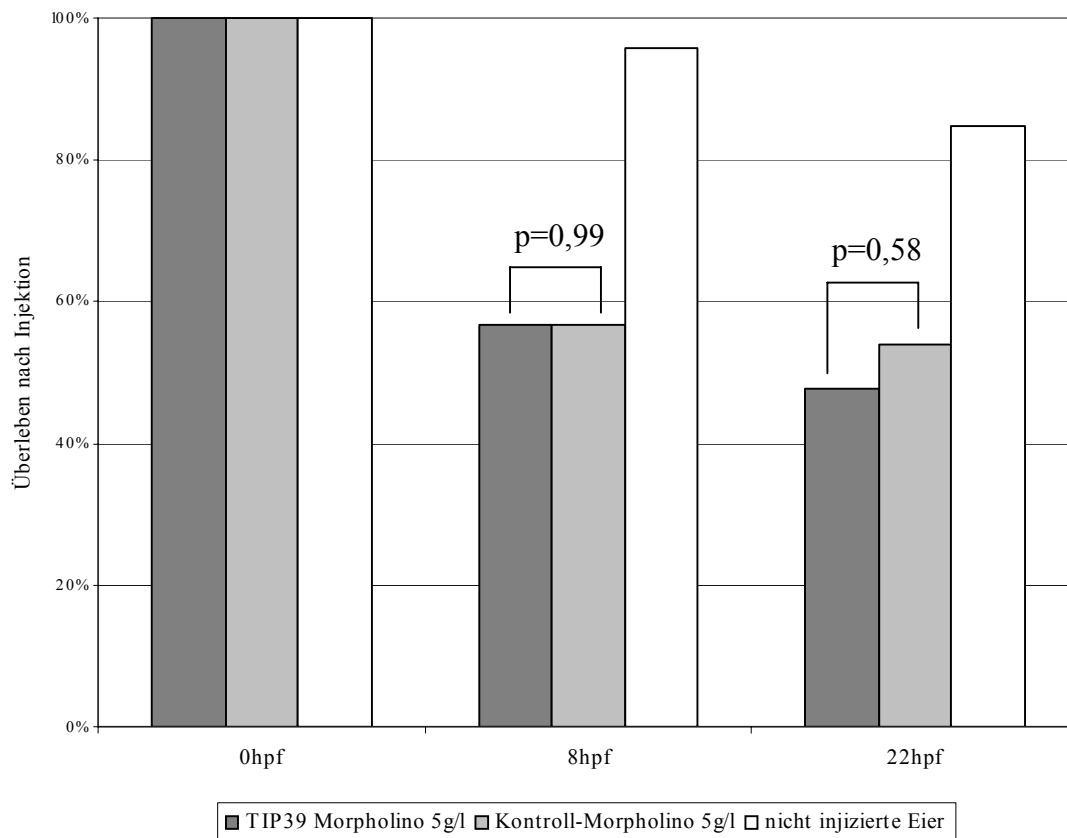


**Abb. 17: Expression von TIP39 im Zebrafischhirn.** Die mit den Pfeilen markierten blauen Signale zeigen die TIP39 mRNA Expression an Zebrafischembryonen (16 hpf) mittels *in-situ* Hybridisierung. Dargestellt sind eine dorsale (A), eine ventrale (B) und eine laterale (C) Ansicht des sich entwickelnden Zebrafischhirnes. In Ansicht C wurde das Auge zuvor abpräpariert. Zur Orientierung findet sich in D ein Schema des Zebrafischhirnes mit anterior commissure (AC), dorsal rostral cluster (DRC), dorsoventral diencephalic tract (DVDT), medial longitudinal fascicle (MLF), posterior commissure (PC), postoptic commissure (POC), supraoptic tract (SOT), tract of the posterior commissure (TPC), tract of the postoptic commissure (TPOC), ventral tegmental commissure (VTC).

#### 4.1.9 TIP39 Knockdown mittels Morpholino-Injektion

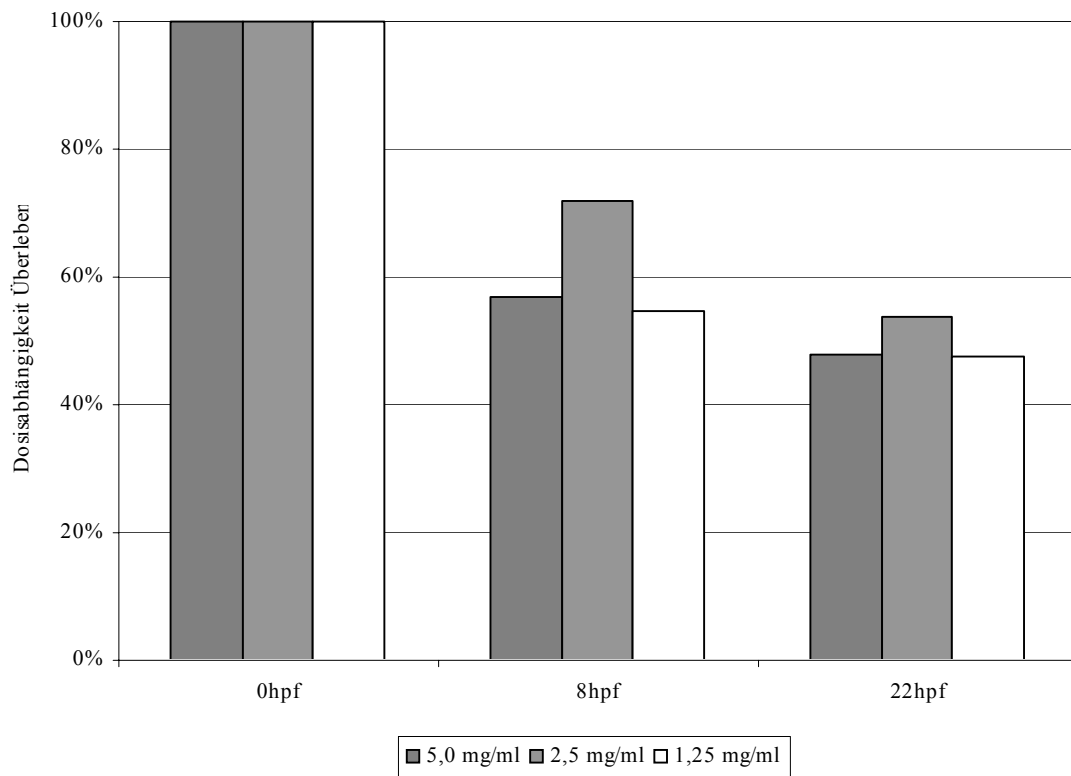
Es wurden Injektionsexperimente an jeweils ca. 40 Zebrafischeiern analog zu 3.8.2 durchgeführt. Eine etwa gleichgroße Anzahl von Eiern wurde jeweils unbehandelt mit beobachtet. Zur Anwendung kamen hierbei ein Morpholino, das gegen die TIP39 mRNA entwickelt wurde, ferner ein Kontroll-Morpholino mit einer Basenfolge, die aufgrund ihres artifiziellen Charakters keine spezifische Bindung eingeht und somit lediglich eine toxische Wirkung ausgeschlossen werden kann. Die Sequenz, die das Morpholino erkennt, ist in Abb. 9 zu sehen. Zunächst konnte gezeigt werden, dass sowohl TIP39-Morpholino-, als auch Kontroll-Morpholino-injizierte Zebrafischeier, die gleiche Überlebensrate nach 8 bzw. 22 Stunden zeigten (Abb. 18). Bei fast

vollständigem Überleben in der Gruppe der nicht-injizierten Zebrafischeier wird dies als Folge des Injektionstraumas erklärt.



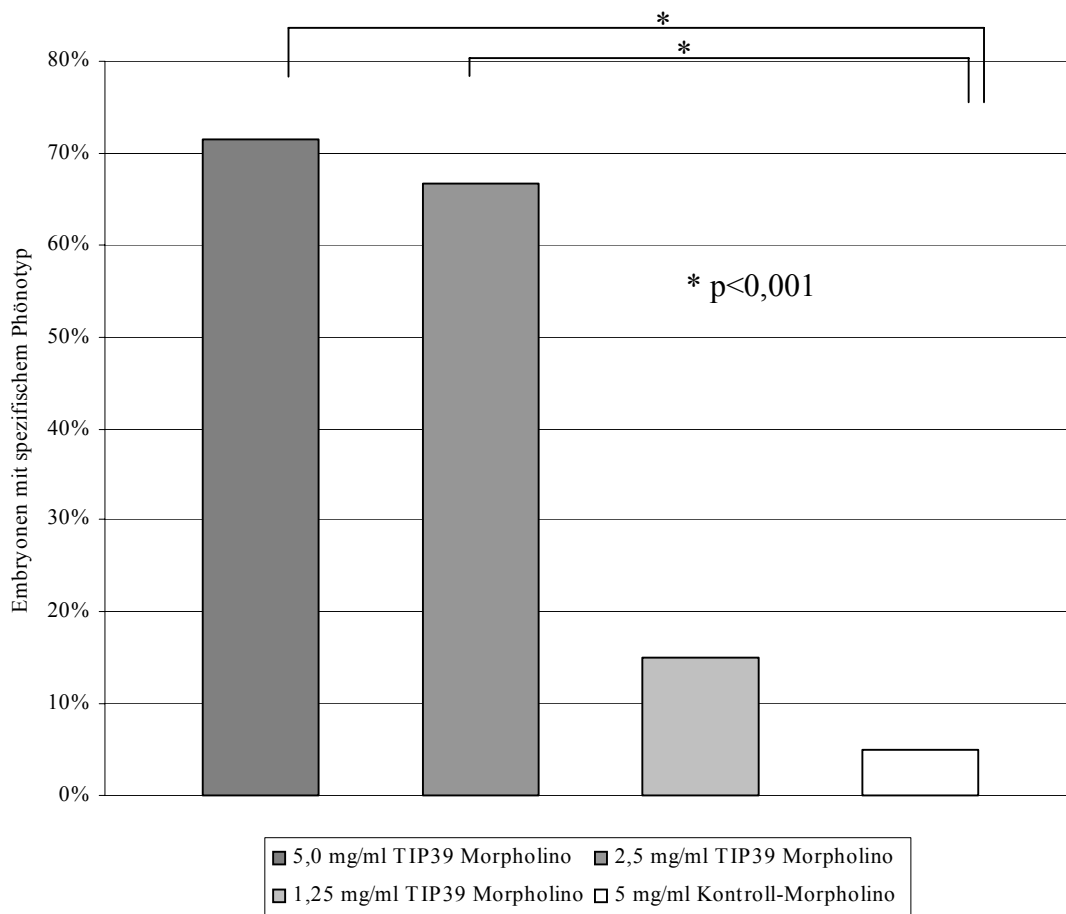
**Abb. 18: Vergleich des Überlebens abhängig von der Art des Morpholinos.** Zwar zeigt sich in beiden Morpholino-Gruppen eine deutliche Letalität durch die Injektionsbehandlung im Vergleich zu den nicht injizierten Eiern (52% (TIP39-Morpholino, 5g/l) bzw. 46% (Kontroll-Morpholino) vs 15% (keine Injektion) nach 22 h;  $P < 0.0001$  Injektion vs Nicht-Injektion) allerdings unterscheiden sich die beiden Morpholino-Gruppen untereinander nicht in der Letalität ( $P = 0.99$  nach 8h;  $P = 0.58$  nach 22h). Mittelwertvergleich zweier unabhängiger Stichproben nach Student-T-Test mit Testung auf Varianzgleichheit nach Levene Test.

In der Folge wurden TIP39-Morpholinos in absteigender Konzentration injiziert. Hierbei zeigte sich, dass das Überleben der Embryonen auch nicht von der Morpholino-Konzentration abhängig ist (Abb. 19), eine spezifische Toxizität erscheint somit ausgeschlossen.



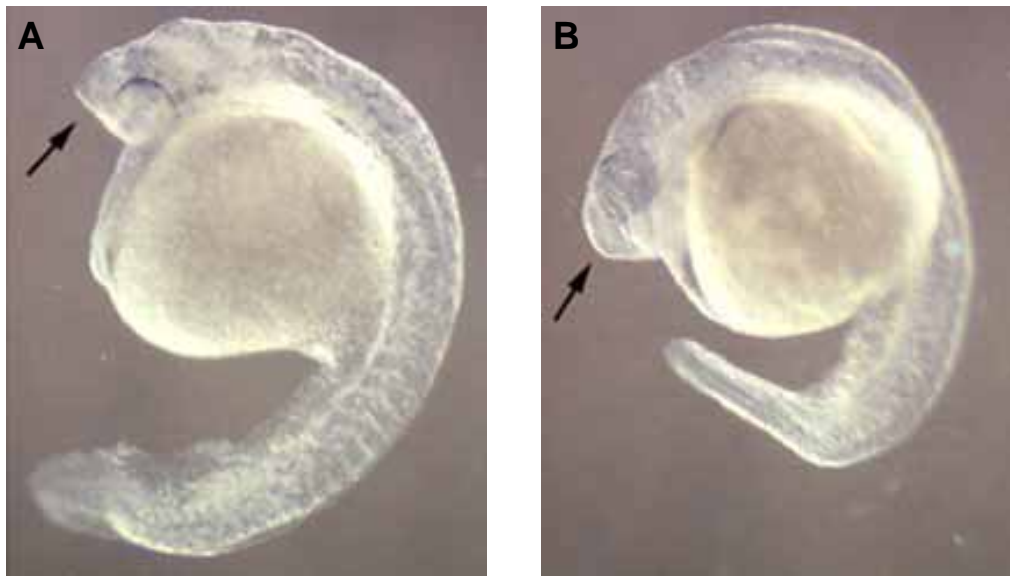
**Abb. 19: Überleben nach Morpholino-Injektion in Abhängigkeit der Dosis.** Für keine der drei gewählten Konzentrationen konnte ein signifikant unterschiedliches Überleben nachgewiesen werden, weshalb der TIP39 Knockdown mit keiner erhöhten Letalität der Embryonen assoziiert scheint (nach 8h  $P=0.23$ , nach 22h  $P=0.82$ ). Unabhängigkeitstestung mit Chi-Quadrat Test nach Pearson.

Bei Anwendung absteigender Konzentrationen von TIP39-spezifischem Morpholino zeigte sich allerdings eine deutliche Dosisabhängigkeit der Ausbildung eines spezifischen Phänotyps. Hierbei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen 5,0 und 2,5 mg/ml, beide Konzentrationen zeigten aber eine signifikant höhere Rate an Ausprägungen des spezifischen Phänotyps, als eine Konzentration von 1,25 mg/ml, welche sich wiederum nicht signifikant vom Kontroll-Morpholino unterschied.



**Abb. 20: Konzentrationsabhängige Ausprägung eines spezifischen Phänotyps.** Zu sehen sind die prozentualen Anteile der nach 22 hpf. überlebenden Embryonen, die den spezifischen Phänotyp ausgebildet haben. Signifikante Unterschiede bestehen hierbei zwischen 5,0 bzw. 2,5 zu 1,25 mg/ml ( $P=0.02$  jeweils) bzw. Kontroll-Morpholino ( $P<0.0001$  jeweils). Keine signifikanten Unterschiede bestehen allerdings zwischen 5,0 und 2,5 mg/ml ( $P=0.86$ ), ebenso nicht zwischen 1,25 mg/ml und dem Kontroll-Morpholino ( $P=0.36$ ). Mittelwertvergleich zweier unabhängiger Stichproben nach Student-T-Test mit Testung auf Varianzgleichheit nach Levene Test.

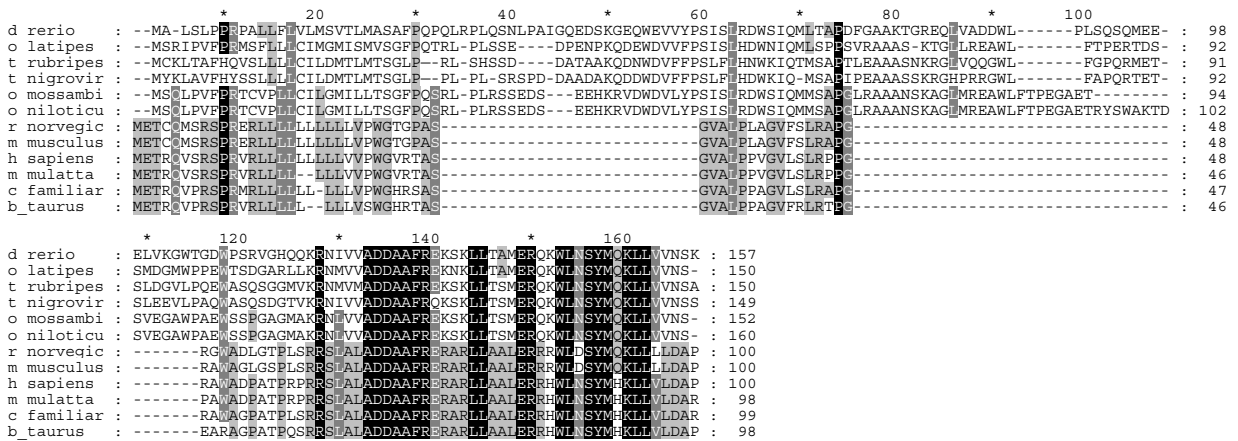
Wir fanden nach TIP39 Knockdown mittels Morpholino-Injektion einen spezifischen Phänotyp, der sich durch einen deutlichen Defekt im Bereich des Frontalhirns und einer Verplumpung des Achsenskeletts auszeichnete (Vgl. Abb. 30). Zudem zeigten die Larven keine Reaktion auf Berührungstimulus wie normale Tiere, einer Reaktion die einem angeborenen Fluchtrefflex entspricht.



**Abb. 21: Spezifischer Phänotyp nach TIP39-Knockdown (48hpf).** Mit den Pfeilen ist der Frontalhirndefekt bei TIP39 Knockdown mittels 12,5 mg/ml Morpholino-Injektion in A zusehen, während der nicht injizierte Zebrafisch in B ein normales Frontalhirn entwickelt. Auch die Verplumpung des Achsenskeletts resultierend aus fehlenden spontanen Kontraktionen des Schwanzes, wie sie bei dem Wildtyp Zebrafisch in B zu sehen sind, zeigt die Abbildung.

#### 4.2 Sequenzvergleiche TIP39 verschiedener Spezies

Mit dem Programm ClustalW (3.1.15) konnten die bekannten Aminosäure Sequenzen für TIP39 verschiedener Spezies verglichen werden. Das Programm fügt die sich entsprechenden Abschnitte zusammen und benennt dabei gleiche und ähnliche Aminosäuren. In Abb. 22 sind die Resultate dieses Vergleichs zu sehen, wobei die drei oberen Zeilen drei Fischarten gehören.



**Abb. 22: Aminosäure-Sequenzvergleiche verschiedener TIP39 Preprohormone.** Im Signalpeptid sowie der eigentlichen TIP39-Sequenz findet sich eine starke Sequenzhomologie, während im Zwischenpeptid deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies bestehen. Die angegebenen Sequenzen von Fugu, Tetraodon und Hund wurden direkt von genomischen Sequenzen abgeleitet. Verwendete Accession No.: d\_rerio (danio rerio, NP\_991140), o\_mossambi (oreochromis mossambicus, AAY32938), o\_niloticu (dreochromis niloticus, AAY32937), t\_rubripes (takifugu rubripes, CAAB01003589.1), t\_nigrovir (tetraodon nigroviridis, CAG12455), r\_norvegic (rattus norvegicus, XP\_001079083), m\_musculus (mus musculus, AAK84862), h\_sapiens (homo sapiens, AAH93995), m\_mulatta (macaca mulatta, XP\_001114966), c\_familiar (canis familiaris, XP\_854766) and b\_taurus (bos taurus, XP\_875079). Die Medaka (o\_latipes) Sequenz wurde aus verschiedenen WGS Sequenzen abgeleitet, gewonnen aus dem Medaka Genom Projekt (<http://dolphinslab.nig.ac.jp/medaka/index.php>).

### 4.3 Auswertung der *in situ*-Hybridisierung von murinem TIP39 am Mäusehirn

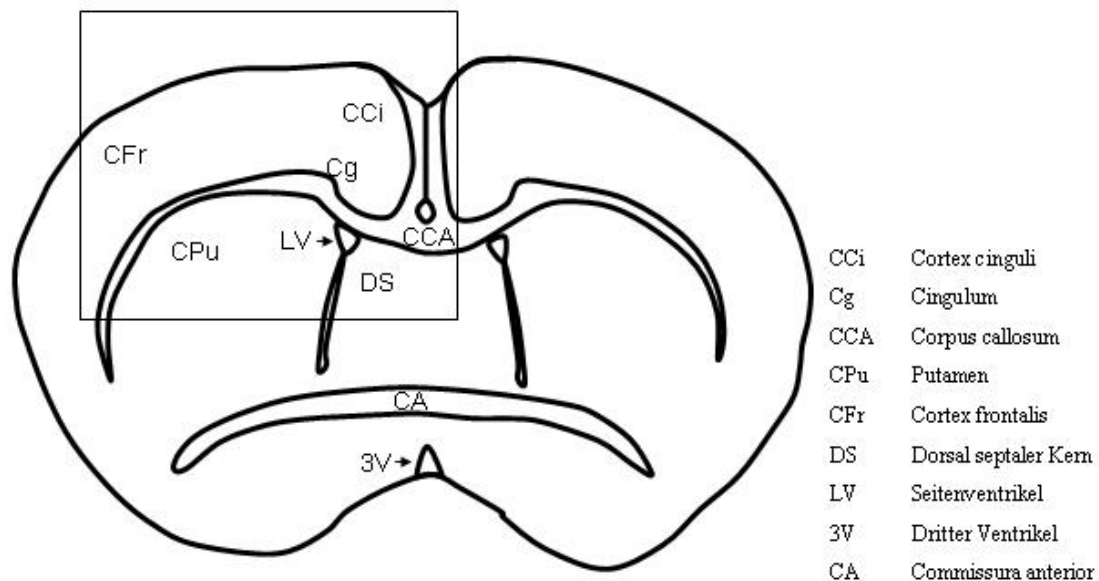
#### 4.3.1 Ergebnis des Dot Blots

Das unterschiedliche Färbepotential der Antisense Sonde (AS), also der TIP39 Sonde und der Sense Sonde zeigte ein etwa gleichstarkes Signal bei 1 ng/μl. Das Signal der Sense Sonde war auch noch bei 10 pg/μl detektierbar, das der Antisense Sonde nicht.

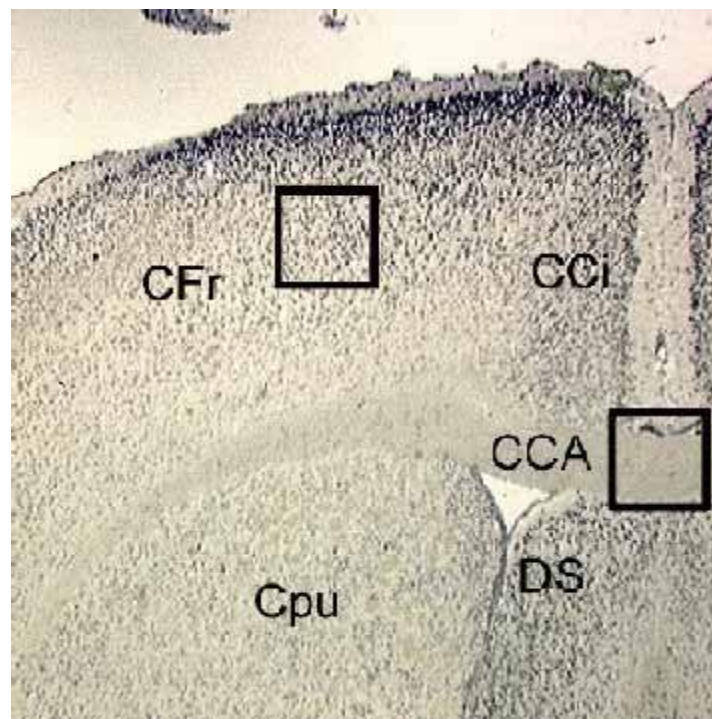
#### 4.3.2 Nachweis von TIP39 mRNA im Cortex des Mäusehirns

In der *in situ*-Hybridisierung gelang der Nachweis von TIP39 mRNA in vielen Neuronen über das ganze Gehirn verteilt. Es fanden sich besonders starke Signale im Kortex, subkortikalen Arealen, dem Putamen und in den septalen Nuclei (siehe Abb. 24).

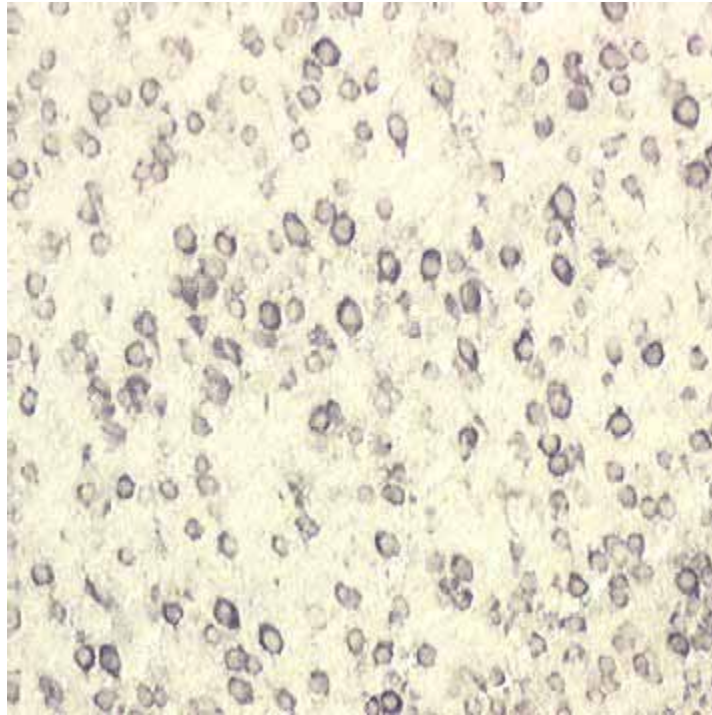




**Abb. 23: Schema eines Schnitts durch das Mäusehirn in der Coronarebene (Bregma 0.14).** Zur Veranschaulichung des in Abb. 24 gezeigten Ausschnitts ist dieser mit dem rechteckigen Rahmen umrissen. Die Schemazeichnung wurde in Anlehnung an den Online-Atlas des Mäusehirns auf [www.mbl.org](http://www.mbl.org) angefertigt.



**Abb. 24: *in situ*-Hybridisierung für TIP39 in der Coronarebene.** Zu sehen ist eine Übersichtsaufnahme, in der die weite Verteilung der Signale auf die TIP39 Sonde im Cortex frontalis (CFr), dem Cortex cinguli (CCi), im Putamen (Cpu) und im dorsal septalem Nucleus (DS) zu erkennen ist. Der linke Rahmen markiert den Ausschnitt von Abb. 25, der rechte Rahmen den von Abb. 26 (12,5 fache Vergrößerung).



**Abb. 25:** *in situ*-Hybridisierung für TIP39 in der Coronarebene. Ausschnitt aus dem frontalen Kortex. Man sieht verschiedene Neurone über verschiedene Schichten des Cortex verteilt, die eine Expression der TIP39 mRNA zeigen (100 fache Vergrößerung).

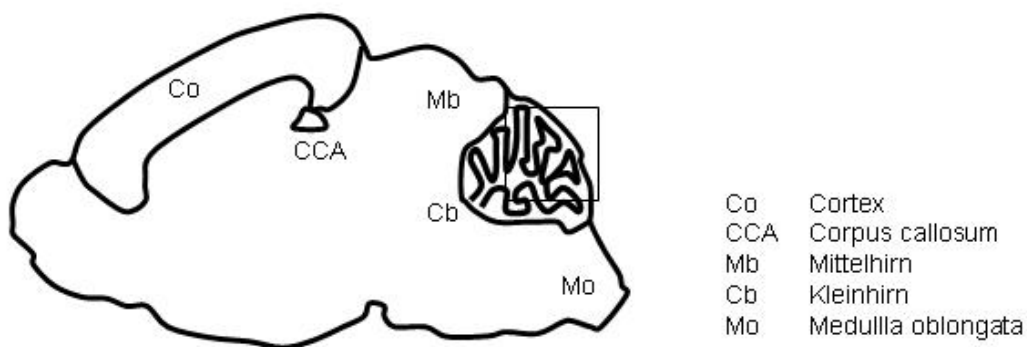


**Abb. 26:** *in situ*-Hybridisierung für TIP39 in der Coronarebene. Ausschnitt aus dem Corpus callosum. Auffallend ist hier, dass sich im zellreichen Corpus callosum keine Signale der TIP39 Sonde finden lassen (100 fache Vergrößerung).

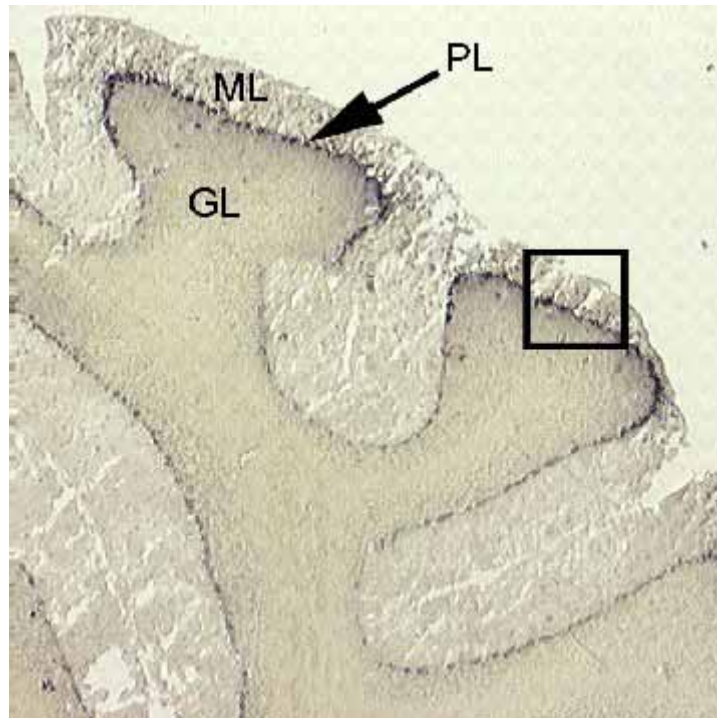
Auffällig war das Fehlen eines Nachweises von TIP39 mRNA im zellreichen Corpus callosum, wie in Abb. 26 zu sehen.

#### 4.3.3 Nachweis von TIP39 mRNA im Kleinhirn des Mäusehirns

Eine weitere Region des ZNS mit starker Transskription von TIP39 mRNA war das Kleinhirn, in dem besonders die Purkinje-Zellen und Zellen der Molekularzellschicht starke Signale zeigten. Hingegen die Granularzellschicht blieb ungefärbt.



**Abb. 27: Schema eines medianen Sagittalschnitts durch das Mäusehirn.** Zur Orientierung der Kleinhirnschnitte zeigt diese Schmazeichnung eingerahmt den Ausschnitt von Abb. 28. Sie ist an den Online-Atlas des Mäusehirns auf [www.mbl.org](http://www.mbl.org) angelehnt.



**Abb. 28:** *in situ*-Hybridisierung für TIP39 in der Sagittalebene. Der Ausschnitt aus dem Mäuse-Kleinhirn zeigt Sondensignale in der Molekularzell-Schicht (ML) und in Purkinje-Zellen (PL), dagegen ist die Granularzell-Schicht (GL) nahezu frei von Signalen. Der Rahmen weist auf den Ausschnitt von Abb. 29 hin (12,5 fache Vergrößerung).

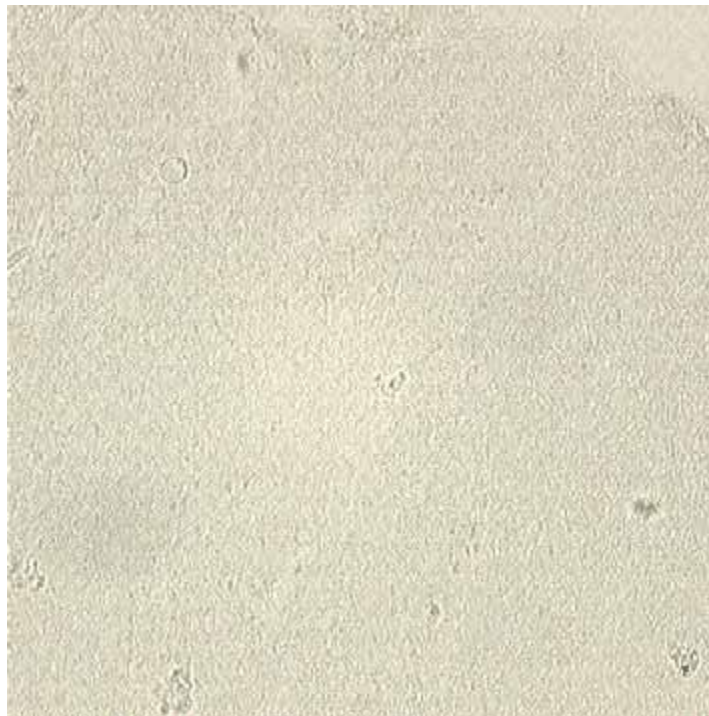


**Abb. 29:** *in situ*-Hybridisierung für TIP39 in der Sagittalebene. Ausschnitt aus dem Kleinhirnkortex. Hier zeigt sich noch besser die deutliche Signalintensität in den Purkinje-Zellen und in der Molekularzell-Schicht (100 fache Vergrößerung).



### **Kontrolle mittels einer Sense-Sonde**

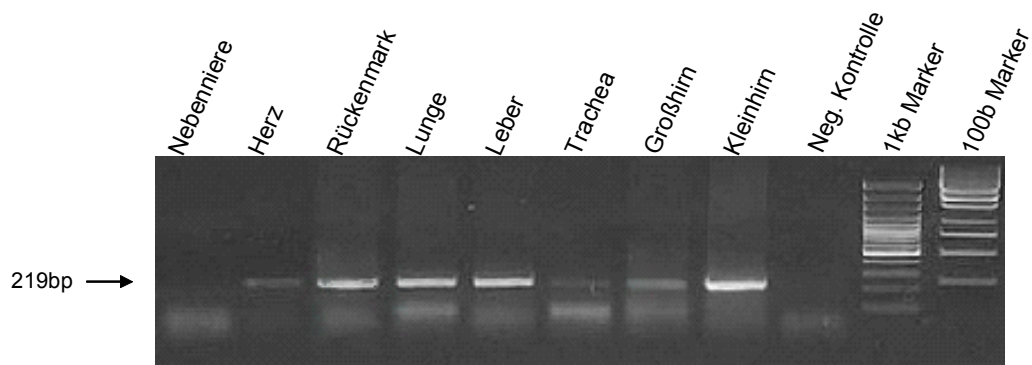
Gleichzeitig zum Nachweis der spezifischen mRNA, wird auch eine komplementäre Sonde, die Sense Sonde an den Schnitten hybridisiert, um unspezifische Signale auszuschließen. Im Vergleich zu dem entsprechenden Abschnitt mit der für TIP39 spezifischen Antisense Sonde (siehe Abb. 25) zeigte sich wie stellvertretend in Abb. 30 zu sehen bei der Sense Sonde keine vergleichbaren Signale.



**Abb. 30:** *in situ*-Hybridisierung mit einer der TIP39 Sonde komplementären Sonde. Bei dieser Sense-Sonde zeigen sich im Vergleich zu der Antisense-Sonde keine signifikanten Signale. Der Ausschnitt entspricht dem von Abb. 25.

### **4.3.4 RT-PCR für murines TIP39 in verschiedenen Mausgeweben**

Für eine RT-PCR für das murine TIP39 wurde das Primerpaar mTIP39-mitte und mTIP39\_TATA+30 verwendet. Die vorhergesagte Fragmentlänge lag damit bei 219 Basenpaaren. Es wurde analog der Beschreibung in 3.3.2 vorgegangen. Positiver Nachweis von TIP39 mRNA gelang demnach für das Großhirn, das Kleinhirn, Leber, Lunge und das Rückenmark. Schwache Signale waren in Herz und Trachea zu detektieren. Negativ fiel das Signal der Nebenniere aus (siehe Abb. 31). Ein Rückschluss von der Signalintensität auf die Expressionsstärke kann aus dieser qualitativen Methode jedoch nicht gezogen werden.



**Abb. 31: RT-PCR für murines TIP39.** Es ist der Nachweis von TIP39 mRNA in Hirn, Leber, Lunge, Herz und Rückenmark zu sehen. Das Primerpaar mTIP39-mitte und mTIP39\_TATA+30 bedingen ein PCR-Fragment von 219 bp. Die Negativkontrolle enthält den gesamten Reaktionsansatz außer Template-mRNA.

## 5 Diskussion

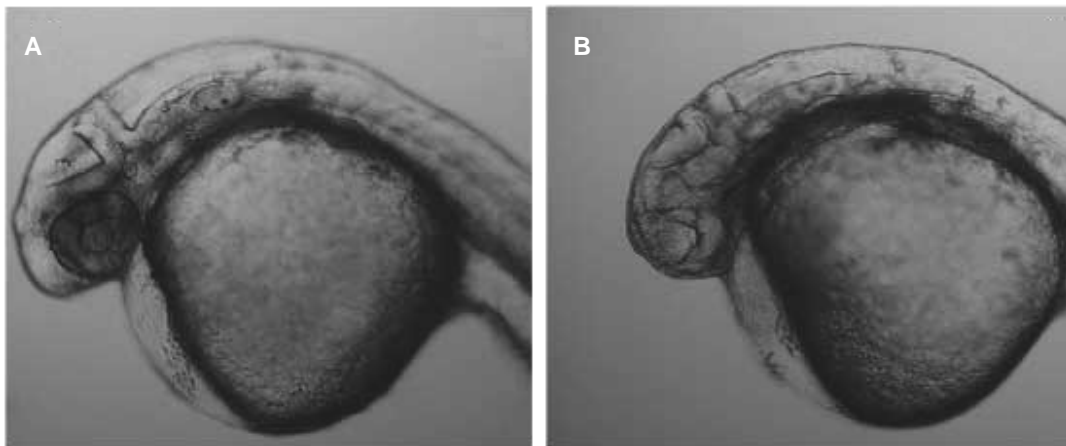
### 5.1 Einfluss von TIP39 auf frühe Neurogenese und Segmentierung in Somiten

Das ZNS des Zebrafisches entwickelt sich aus dem Neuroektoderm, welches sich während der Gastrulation aus dem Ektoderm differenziert<sup>41</sup>. Im Gegensatz zur Entwicklung bei Vertebraten, bei denen sich durch Vereinigung der Seiten der Neuralplatte ein Neuralrohr bildet, besteht beim Zebrafisch zunächst nur ein „Neuralkiel“, welcher sekundär zu einem Neuralrohr umgewandelt wird<sup>42</sup>. Bereits zu diesem Zeitpunkt der Gastrulation sind die ersten Neurone der Neuralplatte postmitotisch. Somit sind die Larven bereits am ersten Tag beweglich und reagieren auf Berührungsreize mit Bewegungen des Achsenskeletts. Für diese Reaktionen sind Pionier-Axone verantwortlich, die in einfachen Reflexbögen eine Art Fluchtreaktion ermöglichen<sup>43</sup>.

Durch die genaue Charakterisierung des TIP39 Gens des Zebrafisches erhielten wir ein sehr gutes Instrument zur Evaluierung des Einflusses von TIP39 während der Entwicklung. Im Zebrafisch gelang bereits zum Zeitpunkt 16 hpf. der Nachweis von TIP39 Expression, was eine mögliche Bedeutung des Peptides bei der Embryogenese implizierte. Beim Knockdown von TIP39 mittels Morpholino-Injektion fiel dann auf, dass die Zebrafische 36 hpf. keine Reaktion auf Berührungsreize zeigten. Auch zeigte sich ein komplettes Fehlen von Spontanbewegungen, beides wäre zu diesem Zeitpunkt zu erwarten. Da der Schwanz der Morpholino-behandelten Zebrafische zudem deutlich verplumpt war, könnte für diese Phänomene eine Störung der korrekten Ausbildung von Pionier-Axonon oder eine Behinderung bei der Ausbildung der Somiten verantwortlich sein. Beispielsweise könnte TIP39 die korrekte Wirkung des Notch-Signalweges hemmen, welcher zur korrekten Somitenausbildung notwendig ist. Notch ist ein Transmembranrezeptor, der nach proteolytischer Spaltung zum Nukleus transloziert wird und seine dort Wirkung durch Anschalten von Gene mit Hilfe verschiedener Transkriptionsfaktoren entfaltet<sup>44</sup>. Normalerweise bilden sich die Schwanzmuskulatur und die zugehörigen Nerven segmental in Somiten, die dem paraaxialen Mesoderm entstammen<sup>45</sup>. Ferner könnte durch den TIP39 Knockdown die korrekte Neurogenese gestört sein. Auch wenn die Wirkung des Morpholinos nach 24 hpf. nicht mehr relevant ist, können doch viele Neurogenesestörungen noch erklärt werden, da die weitere Ausbildung komplexer Neuronenverbände auf das Vorhandensein korrekter Pionier-Axone angewiesen ist.

## 5.2 Bedeutung von TIP39 bei der Entwicklung des Vorderhirns

Für die neuronale Entwicklung bei Vertebraten wird im Allgemeinen ein Zwei-Schritt-Modell angenommen. Zunächst kommt es während der Gastrulation zu einer Aktivierung der gesamten Neuralplatte, sodass diese neuroektodermalen Charakter erhält. In einem zweiten Schritt kommt es zu einer Transformation, wodurch die Neuralplatte in einen vorderen Abschnitt und einen hinteren Abschnitt eingeteilt wird, aus welchen das Gehirn bzw. Rückenmark entstehen. Das Vorderhirn des Zebrafisch-Embryo (Prosencephalon) entsteht aus dem vorderen Ende des Neuralkiels. Es besteht aus dem Telencephalon und dem Diencephalon<sup>46</sup>. Aus dem Vorderhirn entstammen verschiedene Strukturen wie die Retina, die Riechplakoden und die Epiphyse. Verschiedene Gene wurden beschrieben, deren Mutationen zu Veränderungen in der Entwicklung des Vorderhirns führen<sup>47</sup>. Ähnlichkeiten haben die in Abb. 30 gezeigten Veränderungen beim TIP39 Knockdown mit der *masterblind mbl* Mutation (Abb. 32). Insbesondere finden sich auch hier eine Hypoplasie der Riechplakoden. Die Entwicklung der Augen ist in der *mb1* Mutation variabel und reicht von kleineren bis vollständig fehlenden Augen. Weitere Übereinstimmungen finden sich in einer Vergrößerung der Epiphyse.



**Abb. 32: Phänotyp der *masterblind (mbl)* Mutation.** In A ist zum Vergleich ein Wildtyp Zebrafisch 24 hpf. zu sehen. Der Zebrafisch in B hingegen zeigt den Phänotyp der *mb1* Mutation mit Hypoplasie des Vorderhirns, insbesondere der Riechplakoden und des Auges (adaptiert aus Heisenberg et al. ).

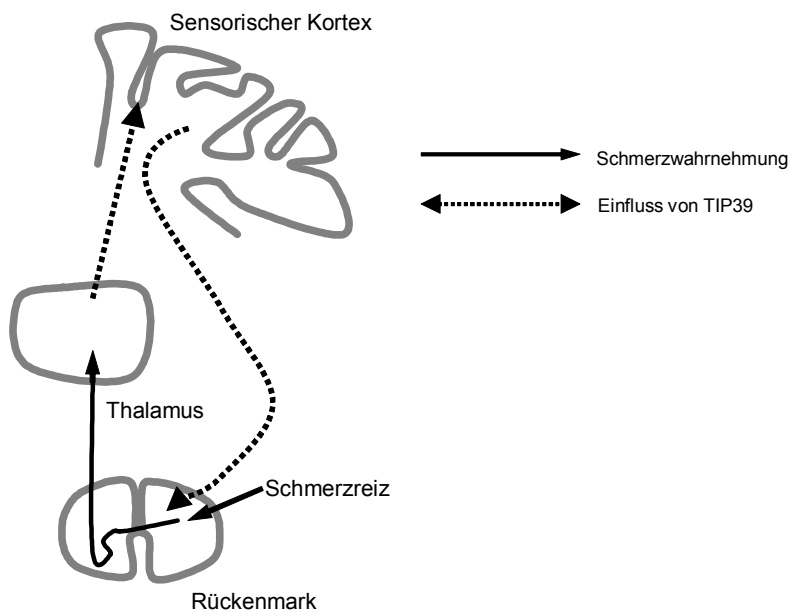
Genaue Analysen sind aber erforderlich zur Klärung der Frage, welche Veränderungen durch das Fehlen von TIP39 verursacht werden, die zu den oben genannten Veränderungen führen. Die phänotypischen Ähnlichkeiten des durch den TIP39



Knockdown entstandenen Phänotyps mit der *mbl* Mutation könnte als Ansatz genutzt werden und die in diesem Zusammenhang als verändert beschriebenen Geneexpressionen auch bei TIP39 Knockdown zu untersuchen.

### 5.3 Einfluss von TIP39 auf die Nozizeption

Es konnte eine sehr weite Streuung der TIP39 Expression über das gesamte Mäusehirn gezeigt werden. Die Areale mit der stärksten Expression waren der Kortex, sowie subkortikale Areale, das Putamen und septale Nuclei. Besonders die weite Verbreitung von TIP39 Expression im Bereich des gesamten Kortex macht eine funktionelle Deutung schwierig. Eine mögliche Funktion ist hier sicherlich im Bereich der Sensorik, insbesondere der Schmerzwahrnehmung zu suchen. Die nachgewiesene Expression präfrontal medial (Abb. 25), welche dem sensorischen Kortex entspricht, könnte auf eine zentralnervöse Bedeutung von TIP39 bei der Schmerzwahrnehmung hinweisen. Im sensorischen Kortex findet sich auch eine starke Expression des PTH2-Rezeptors. Eine Rolle im Bereich der spinalen Weiterleitung von Schmerzsignalen wird bereits seit längerem diskutiert<sup>48</sup>. Im Thalamus jedoch, wo das zweite afferente Neuron der Schmerzsensorik zur Großhirnrinde umgeschaltet wird, fanden wir im Gegensatz zu anderen Autoren keine TIP39 Expression<sup>28,8</sup> bei der Maus, jedoch korrespondierende Signale im Zebrafischhirn (Abb. 17). Im Rückenmark hingegen gelang der Nachweis von TIP39 Expression sowohl beim Menschen, als auch in der Maus (Nachweis von muriner TIP39 RNA mittels RT-PCR, eigene Ergebnisse, hier nicht gezeigt). Der Nachweis einer Sezernierung von TIP39 auf spinaler Ebene gelang jedoch nicht. Gezeigt werden konnte TIP39 Expression v.a. in Hinterhornneuronen, welche v.a. efferente Neurone enthält, weshalb eine Modulation der Weiterleitung des Schmerzsignals auf Segmentebene durch TIP39 angenommen wird. In den Vorderseitensträngen jedoch, die die Afferenz zum Thalamus darstellen, konnte keine TIP39 Expression nachgewiesen werden. Bisher beruhte somit die Vermutung einer Bedeutung von TIP39 bei der Modulation des Schmerzsignals auf dem Vorhandensein von PTH2-Rezeptoren im Bereich der dorsalen Wurzelganglien und der Hinterstrangbahnen sowie der Beobachtung, dass sich im Tierexperiment durch intrathekale TIP39 Applikation ein Schmerzsignal auslösen ließ.



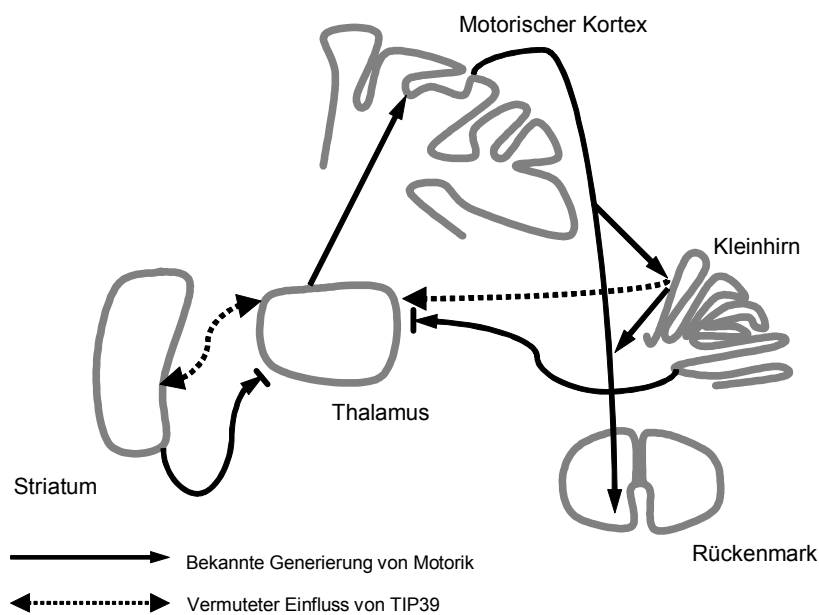
**Abb. 33: Vermuteter Einfluss von TIP39 auf die Schmerzwahrnehmung.** Im Zusammenhang mit der Nozizeption wirkt TIP39 sowohl in der Peripherie modulierend auf die Schmerzweiterleitung auf Segmentebene, als auch zentralnervös bei der Projektion vom Thalamus zum sensorischen Kortex.

Nach unseren Daten könnte TIP39 aber eher bei der supraspinalen Verarbeitung des Schmerzsignals eine Rolle spielen. Ferner könnte eine Modulation der spinalen Afferenz die Schmerzwahrnehmung beeinflussen. Die sich aufdrängende Frage, ob somit das TIP39-PTH2-Rezeptor-System auch bei der Entwicklung neuer Analgetika von Bedeutung ist, kann nicht sicher beantwortet werden. Die Entwicklung eines selektiven PTH2-Rezeptor Antagonisten könnte sicherlich von Nutzen sein, wobei hierfür die notwendige Liquorgängigkeit und Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ausschlaggebend sein würde. Die jedoch über die Nozizeption hinaus gehenden Funktionen von TIP39 bei der Generierung von Bewegung (5.4) und bei der Neurogenese (5.1) lassen allerdings ein nicht unbeträchtliches Nebenwirkungsspektrum eines solchen Antagonisten vermuten.

#### 5.4 Bedeutung von TIP39 bei der Generierung von Bewegung

Im Bereich der Basalganglien fanden sich im Putamen Zellgruppen mit starker TIP39 Expression (Abb. 24), woraus sich eine Bedeutung bei der genauen Steuerung von Bewegungen und der Generierung von Bewegungsmustern ableiten lässt. Diese Neurone benutzen als Transmitter vor allem GABA und wirken über den Nucleus subthalamicus und die Substantia nigra hemmend auf den Thalamus, der das generierte

Bewegungsmuster an den Motokortex weiterleitet. Fehlende Hemmung oder ein Überschießen dieser führt zu Hyper- bzw. Hypokinesie. Ebenso enden Efferenzen des Kleinhirns im Thalamus, welche auch an der Feinsteuerung der generierten Bewegungen mitwirken. In den Purkinje-Zellen, welche die einzigen Efferenzen des Kleinhirns darstellen, fand sich eine ausgeprägte TIP39 Expression (Abb. 28). Im Striatum selbst, zum dem das Putamen gehört, fand sich keine ausgeprägte PTH2-Rezeptor Expression. Verschiedene Kerngebiete des Thalamus weisen hingegen eine sehr starke PTH2-Rezeptor Expression auf.



**Abb. 34: Vermuteter Einfluss von TIP39 auf die Generierung von Bewegungen.**

Starke Expression von TIP39 in Purkinje-Zellen des Kleinhirns lässt einen Einfluss von TIP39 bei der über den Thalamus vermittelten Hemmung von überschießenden Bewegungen vermuten, aber auch die Generierung von Bewegungen in den Basalganglien könnte einer TIP39 Steuerung unterliegen.

TIP39 aus Nervenfasern des Putamen und des Kleinhirns könnte als ein Neurotransmitter fungieren kann, ob es synergistisch zum inhibitorischen GABA wirkt oder eventuell auch einen Gegenspieler in Basalganglienzellen darstellt, kann aus dem hier erbrachten Expressionsnachweis nur gemutmaßt werden. Somit ist sowohl eine Hemmung von Bewegung, als auch ein Überschießen von Bewegungen unter dem Einfluss von TIP39 denkbar. Auch hieraus ergeben sich verschiedene pharmakologische Ansatzpunkte für den Einsatz sowohl von TIP39 selbst, als auch eines PTH2-Rezeptor Antagonisten beispielsweise bei Basalganglienerkrankungen.

### 5.5 Allgemeine Charakterisierung des TIP39-PTH2-Rezeptor-Systems

Weitere Funktionen über die Nozizeption und die Motorik hinaus sind wahrscheinlich, eventuell stellt das TIP39-PTH2-Rezeptor-System eine weitere grundlegende Möglichkeit der neuronalen Signaltransduktion dar. Insgesamt scheint TIP39 jedoch v.a. para- oder autokrin zu wirken, da nach den bisher gefundenen Daten stets eine örtliche Übereinstimmung von TIP39 exprimierenden Fasern und dem PTH2-Rezeptor gefunden wurde bei zudem fehlendem Nachweis einer systemischen Sekretion. Auch zeigt die Analyse der von uns untersuchten Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies (Abb. 22), dass TIP39 die typischen Eigenschaften eines sezernierten Neuropeptids aufweist: So findet sich in allen Spezies eine typische Signalsequenz, welche an einer dibasischen Schnittstelle für Subtilisin-like Proteasen abgetrennt werden kann<sup>49</sup>. In dieser Signalsequenz und dem eigentlichen TIP39 finden sich hohe Übereinstimmungen der Aminosäuresequenz, sodass sowohl der Charakter eines sezernierten Neuropeptids, als auch das eigentliche TIP39 in der Evolution konserviert wurden und dem TIP39-PTH2-Rezeptor-System somit eine wichtige Bedeutung zuzukommen scheint. Nach unserer Ansicht handelt es sich beim TIP39 somit am ehesten um einen para- oder autokrin wirkenden Neurotransmitter.

Eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels über den PTH1-Rezeptor, wenngleich TIP39 an diesem als funktioneller Antagonist wirkt, erscheint damit weniger wahrscheinlich. Da der PTH1-Rezeptor v.a. in den Nieren und Knochen exprimiert wird<sup>50</sup> müsste für TIP39 eine endokrine Funktion postuliert werden, da bisher kein gesicherter TIP39 Nachweis in diesen Organen gelang.

### 5.6 Zusammenfassung

Das Tuberoinfundibuläre Peptid von 39 Aminosäuren (TIP39), ein kurzes Oligopeptid mit einer N-terminalen und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix, wurde ursprünglich bei der Suche nach einem Liganden für den neu beschriebenen PTH2-Rezeptor aus einem Hypothalamus-Hypophysen-Extrakt isoliert. Aus der bisherigen Charakterisierung von TIP39 ist am meisten bekannt bezüglich der Expressions-Muster und der Interaktion am PTH2-Rezeptor. TIP39 ist der stärkste bekannte Aktivator des PTH2-Rezeptors und wirkt am PTH1-Rezeptor als funktioneller Antagonist. Inzwischen wurde auch das TIP39 Gen des Menschen *homo sapiens* und der Maus *mus musculus* charakterisiert. Die physiologische Rolle von TIP39 ist dennoch bisher weitgehend ungeklärt, diskutiert

werden Einflüsse auf den Kalzium-Phosphat-Haushalt, die Hypothalamus.Hypophysen-Achse oder die Nozizeption.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des TIP39 kodierenden Gens des Zebrafischs *danio rerio*. Die komplette cDNA konnte amplifiziert werden und wurde unter der Accession No. AF486190 in der GenBank veröffentlicht. Der Genlocus konnte mittels Radiation Hybrid Mapping auf Chromosom 17 lokalisiert werden. Die 3 charakterisierten Exons und 2 Introns umfassen zusammen ca. 3750 bp. Daneben wurde die Prozessierung des Genprodukts aufgeklärt: TIP39 wird beim Zebrafisch als Preprohormon translatiert, am N-terminalen Ende findet sich eine 25 Aminosäuren lange Signalsequenz, die für sezernierte Peptide typisch ist und welche für die Aufnahme in das Endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist. In diesem Bereich finden sich eine weitgehende Übereinstimmungen zwischen den analysierten Spezies. Gefolgt wird die Zielsequenz von einem 93 Aminosäuren langen Zwischenpeptid, das sich als wenig konserviert zwischen den Spezies zeigt. Die eigentliche Sequenz von TIP39 beim Zebrafisch zeigte eine Sequenzhomologie von 59% zur humanen Sequenz und wurde mittels Blast Suche als hochkonserviert in allen 12 untersuchten Spezies wiedergefunden. Im genomischen Southern-Blot zeigte sich, dass TIP39 beim Zebrafisch im einfachen Chromosomensatz ein „single-copy“ Gen ist. Mittels RT-PCR konnte eine sehr frühe erste Expression von TIP39 bereits ab 16 Stunden nach Fertilisation gezeigt werden. Im Bereich des supraoptischen Trakts des Zebrafischhirn konnte eine scharf umschriebene Zellpopulation mit starker TIP39-Expression detektiert werden. Durch Knockdown-Experimente konnte beim Zebrafisch gezeigt werden, dass ein Fehlen von TIP39 Expression während der Embryogenese zu einer Fehlentwicklung des Frontalhirns führt und zudem mit einer Funktionsbeeinträchtigung der Schwanzmotorik einhergeht. Hierfür wurden gerade befruchteten Zebrafischeiern im Zwei-Zell-Stadium sogenannte „Morpholinos“ injiziert, welche als Antisense-Nukleotide spezifisch die Translation von TIP39 hemmen. Ergänzend konnte im Mäusehirn die Expression von TIP39 mittels *in-situ* Hybridisierung bestimmt werden. Es zeigte sich eine Expression von TIP39 in einer Vielzahl von klar umschriebenen Neuronengruppen, so im Hypothalamus, dem limbischen System und in sensorischen Neuronen, ohne dass sich im Einzelfall jeweils sicher eine Funktion hieraus ableiten lässt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass TIP39 zur korrekten Neurogenese bei der Entwicklung des Frontalhirns des Zebrafisches

unabdingbar ist und auch die frühe Entwicklung der Motoneurone durch TIP39 beeinflusst wird. Die ermittelten Daten unterstützen die Vorstellung von TIP39 als ein sezerniertes Neuropeptid, das als Transmitter in der Sensorik, insbesondere der Nozizeption, wirkt. Auch eine Beeinflussung der zentralnervösen Steuerung der Motorik durch TIP39 wird angenommen. Die gute Lokalisations-Übereinstimmung der Expressionen von TIP39 mit seinem zugeordneten Rezeptor, dem PTH2-Rezeptor, lässt eine systemische endokrine Wirkung von TIP39 wenig wahrscheinlich erscheinen, sondern stärkt die Hypothese von TIP39 als einem para-, bzw. autokrin wirkenden Neurotransmitter.

## 6 Literaturverzeichnis

---

- <sup>1</sup> **Usdin TB, Gruber C & Bonner TI (1995)**. Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* **270**, 15455–15458.
- <sup>2</sup> **Wang T, Palkovits M, Rusnak M, Mezey E, Usdin TB (2000)**. Distribution of parathyroid hormone-2 receptor-like immunoreactivity and messenger RNA in the rat nervous system. *Neuroscience* **100**, 629-249.
- <sup>3</sup> **Fraser RA, Kronenberg HL, Pang PK, Harvey S (1990)**. Parathyroid hormone messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus. *Endocrinology* **127**, 2517–2522.
- <sup>4</sup> **Balabanova S, King O, Teller WM, Reinhard G (1985)**. Distribution and concentration of immunoreactive parathyroid hormone in brain and pituitary of sheep. *Klin Wochenschr* **63**, 419-422.
- <sup>5</sup> **Balabanova S, Peter J, Reinhard G (1986)**. Parathyroid hormone secretion by brain and pituitary of sheep. *Klin Wochenschr* **64**, 173-176.
- <sup>6</sup> **Usdin TB (1997)**. Evidence for a parathyroid hormone-2 receptor selective ligand in the hypothalamus. *Endocrinology*. **138**, 831–838.
- <sup>7</sup> **Usdin TB, Hoare SRJ, Wang T, Mezey E, Kowalak JA (1999)**. TIP39: a new neuropeptide and PTH2 receptor agonist from hypothalamus. *Nat Neurosc.* **2**, 941–943.
- <sup>8</sup> **John MR, Arai M, Rubin DA, Jonsson KB, Juppner H (2002)**. Identification and characterization of the murine and human gene encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Endocrinol* **143**, 1047–1057.
- <sup>9</sup> **Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B, Blind E (2002)**. Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. *J Endocrinol* **174**, 95–102.
- <sup>10</sup> **Usdin TB, Wang T, Hoare SRJ, Mezey E, Palkovits M (2000)**. New Members of the Parathyroid hormone/Parathyroid Hormone Receptor Family: The Parathyroid Hormone 2 Receptor and Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues. *Front Neuroendocrinol* **21**, 349–383.
- <sup>11</sup> **Piserchio A, Usdin TB, Mierke DF (2000)**. Structure of Tuberoinfundibular Peptide (TIP39). *J Biol Chem*, **275**: 27284–27290.
- <sup>12</sup> **Hoare SRJ, Clark JA, Usdin TB (2000)**. Molecular Determinants of Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues (TIP39) Selectivity for the Parathyroid Hormone-2 (PTH2) Receptor. *J Biol Chem* **275**, 27274–27283.
- <sup>13</sup> **Wang J, Palkovits M, Usdin TB, Dobolyi A (2005)**. Afferent connections of the subparafascicular area in rat. *Neuroscienc.*
- <sup>14</sup> **Nissenson RA, Huang Z, Blind E, Shoback D (1993)**. Structure and function of the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. *Receptor* **3**, 193-202.

- <sup>15</sup> **Karpalis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC (1994).** Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev* **8**, 277-289.
- <sup>16</sup> **Karaplis AC (2001).** PTHrP: novel roles in skeletal biology. *Curr Pharm Des* **7**, 655-670.
- <sup>17</sup> **Philbrick WM, Wysolmerski JJ, Galbraith S, Holt E, Orloff JJ, Yang KH, Vasavada RC, Weir EC, Broadus AE, Stewart AF (1996).** Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* **76**, 127–173.
- <sup>18</sup> **Bayne MC, Illidge TM (2001).** Hypercalcaemia, parathyroid hormone-related protein and malignancy. *Clin Oncol.* **13**, 372-377.
- <sup>19</sup> **Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji EH, Gorn A, Kolakowski LF, Lodish HF, Goldring SR (1991).** Expression cloning of an adenylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science.* **254**, 1022–1024.
- <sup>20</sup> **Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S (1991).** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J* **10**, 1635–1641.
- <sup>21</sup> **Horn F, Bywater R, Krause G, Kuipers W, Oliveira L, Paiva AC, Sander C, Vriend G (1998).** The interaction of class B G protein-coupled receptors with their hormones. *Receptors Channels* **5**, 305–314.
- <sup>22</sup> **Gardella TJ and Juppner H (2001).** Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends En-docrinol Metab.***12**, 210-217.
- <sup>23</sup> **Juppner H (1994):** Molecular cloning and characterization of a parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor: a member of an ancient family of G protein-coupled receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* **3**; 371-378.
- <sup>24</sup> **Offermanns S, Iida-Klein A, Segre V and Simon MI (1996).** G alpha q family members couple parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide and calcitonin receptors to phospholipase C in COS-7 cells. *Mol Endocrinol.* **10**; 566-574.
- <sup>25</sup> **Usdin TB, Bonner TI, Harta G, Mezey E (1996).** Distribution of parathyroid hormone-2 receptor messenger ribonucleic acid in rat. *Endocrinology* **137**, 4285–4297
- <sup>26</sup> **Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Serge G, Mezey E (1999).** Distribution of the Parathyroid 2 Receptor in Rat: Immunolocalization Reveals Expression by Several Endocrine Cells. *Endocrinology* **140**, 3363-3371.
- <sup>27</sup> **Seeliger S, Hausberg M, Eue I, Usdin T, Rahn KH, Kosch M (2003).** The parathyroid hormone-2 receptor is expressed on human leukocytes and down-regulated in hyperparathyroidism. *Clin Nephrol* **59**, 429-435.
- <sup>28</sup> **Doblyi A, Ueda H, Uchida H, Palkovits M, Usdin TB (2001).** Anatomical and physiological evidence for involvement of tuberoinfundibular peptide of 39 residues in nociception.
- <sup>29</sup> **Ward HL, Small CJ, Murphy KG, Kennedy AR, Ghatei MA, Bloom SR (2001).** The actions of tuberoinfundibular peptide on the hypothalamo-pituitary axes. *Endocrinology* **142**, 3451-3456.



- <sup>30</sup> **Gao P, Scheibel S, D'Amour P, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H, Cantor TL (2001)**. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1–84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *Journal of Bone and Mineral Research* **16**, 605–614.
- <sup>31</sup> **Eichinger A, Fiaschi-Taesch N, Massfelder T, Fritsch S, Barthelmebs M, Helwig JJ (2002)**. Transcript Expression of the Tuberoinfundibular Peptide (TIP)39/PTH2 Receptor System and Non-PTH1 Receptor-Mediated Tonic Effects of TIP39 and Other PTH2 Receptor Ligands in Renal Vessels. *Endokrinology* **143**, 3036-3043.
- <sup>32</sup> **Endlich K, Massfelder T, Helwig JJ, Steinhausen M (1995)**. Vascular effects of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in the split hydronephrotic rat kidney. *J Physiol (Lond)* **483**, 481–490.
- <sup>33</sup> **Turner PR, Mefford S, Christakos S, Nissenson RA (2000)**. Apoptosis mediated by activation of the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein (PTHrP). *Mol Endocrinol* **242**, 241–254.
- <sup>34</sup> **Misiano P, Scott BB, Scheideler MA, Garnier M (2003)**. PTH2 receptor-mediated inhibitory effect of parathyroid hormone and TIP39 on cell proliferation. *Europ J Pharmacol* **468**, 159-166.
- <sup>35</sup> **Ross G, Engel P, Abdallah Y, Kummer W, Schluter KD (2005)**. Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues: A New Mediator of Cardiac Function via Nitric Oxide Production in the Rat Heart. *Endocrinology* **146**, 2221-2228.
- <sup>36</sup> **Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann Band Schilling TF (1995)**. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203**, 253–310.
- <sup>37</sup> **Brian C, Schaefer (1995)**. Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning Full-Length cDNA Ends. *Analytical Biochemistry* **227**, 255-273.
- <sup>38</sup> **Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PM (2001)**. Reverse Transkriptase Template Switching: A SMART™ Approach for Full-Length cDNA Library Construction. *BioTechniques* **30**, 892-897.
- <sup>39</sup> **Hukriede NA, Joly L, Tsang M, Miles J, Tellis P, Epstein JA, Barbazuk WB, Li FN, Paw B, Postlethweiti JH, Hudson TJ, Zon LI, McPherson JD, Chevrette M, Dawid IB, Johnson SL, Ekker M (1999)**. Radiation hybrid mapping of the zebrafish genome. *Genetics* **96**, 9745-9750.
- <sup>40</sup> **Hauptmann G, and Gerster T (1994)**. Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and Drosophila embryos. *Trends Genet* **10**, 266.
- <sup>41</sup> **Blader P and Straehle U (2000)**. Zebrafish developmental genetics and central nervous system development. *Hum Mol Genet* **9**, 945-951.
- <sup>42</sup> **Papan C and Campos-Ortega JA (1994)**. On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish. *Wilhelm Roux's Arch Dev Biol* **203**, 178-186.
- <sup>43</sup> **Kimmel CB, Patterson J and Kimmel RJ (1974)**. Development and behavioral characteristics of the startle response in the zebrafish. *Dev psychobiol* **7**, 47-60.

- <sup>44</sup> **Struhl G, Adachi A (1998)**. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* **93**, 649–660.
- <sup>45</sup> **Holley SA, Nüsslein-Volhard C (2000)** . Somitogenesis in Zebrafish. *Curr Top Dev Biol* **47**, 247-277.
- <sup>46</sup> **Ross LS, Parrett T and Easter S Jr (1992)**. Axonogenesis and morphogenesis in the embryonic zebrafish brain. *J Neurosc.* **12**, 467-482.
- <sup>47</sup> **Heisenberg CP, Brand M, Jiang YJ, Warga RM, Beuchle D, van Eeden FJM, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J and Nüsslein-Volhard C (1996)**. Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* **123**, 191-203.
- <sup>48</sup> **Usdin TB, Dobolyi A, Ueda H, Palkovits M (2003)**. Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 14–19.
- <sup>49</sup> **Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K and Nakayama K (1991)**. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biolog Chem* **266**, 12127-12130.
- <sup>50</sup> **Urena P, Kong XF, Abou-Samra AB, Juppner H, Kronenberg HM, Potts JT and Segre GV (1993)**. Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* **133**, 617-623.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn PD Dr. Eberhard Blind für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Begleitung während der Umsetzung und dass es mir ermöglicht wurde, Teilergebnisse auf Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie vorzustellen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bruno Allolio für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Endokrinologischen Labor, das kontinuierliche Interesse an dem Fortgang der Arbeit und die Möglichkeit zu beständiger Diskussion.

Die direkte Betreuung lag bei Dr. Immo Hansen, dem für die vorbildliche Einführung in die Hintergründe der Experimente, die ständige Ansprechbarkeit zur Problembewältigung, den mitreißenden Enthusiasmus für die Molekularbiologie und die freundschaftliche Zusammenarbeit auch mein größter Dank gilt.

Herrn PD Dr. Martin Gasser danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Susanne Meyer für die große Hilfestellung bei der technischen Durchführung vieler Experimente.

Ich danke der Arbeitsgruppe von PD Dr. Christoph Winkler, insbesondere Matthias Schäfer, für die Möglichkeit der Nutzung der Zebrafisch Ressourcen im Biozentrum der Universität Würzburg.

Allen Mitarbeitern des endokrinologischen Labors sei für das familiäre Arbeitsklima gedankt, das einem die Arbeit auf sehr schöne Weise erleichtert hat.

Mein letzter und aber wichtigster Dank gilt meiner Familie und allen Freunden, insbesondere Dir Stefani, für Unterstützung, Motivation und Verständnis.

## Lebenslauf Sebastian Fabian Wortmann

Geburtstag und Geburtsort	11. Juni 1977 in Bamberg
1984-1988	Grundschule Altenburgblick Stegaurach
1988-1997	E.T.A. Hoffmann-Gymnasium Bamberg
1997-1998	Zivildienst beim Malteser Hilfsdienst Bamberg
Oktober 1998	Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	1. Staatsexamen
August 2003	2. Staatsexamen
März 2004 – März 2005	Praktisches Jahr
Mai 2005	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
Seit August 2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Medizinischen Klinik I, Endokrinologie, Universitätsklinik Würzburg



### **Veröffentlichte Originalarbeiten und Abstracts zu diesem Thema:**

Characterization of the human and mouse genes encoding the tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a ligand of the parathyroid hormone receptor family. Hansen IA, Jakob O, Wortmann S, Arzberger T, Allolio B, Blind E (2002). Journal of Endocrinology, Ausgabe 174, Seiten 95–102.

Characterization of the Human and Mouse Genes encoding the Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues (TIP39), an Activator of the PTH-2 Receptor. Jakob O, Hansen I, Wortmann S, Allolio B, Blind E. Abstract. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) 2002.

Tuberoinfundibular peptide of 39 residues (TIP39), a ligand of the PTH receptor family may be involved in early brain development in zebrafish. Blind E, Wortmann S, Hansen I, Meyer S, Neuner C, Winkler C. Kongress der American Society for Bone and Mineral Research 2003

The tuberoinfundibular peptide of 39 residues, a natural ligand of the PTH receptor family, affects early brain development in zebrafish. Wortmann S, Hansen I, Meyer S, Neuner C, Winkler C, Allolio B, Blind E. Abstract. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE) 2003.